



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ NON-ALBICANS

Της

Αργυρής Τογκουσίδου
Του Νεκτάριου

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2021

DIPLOMA PROJECT

MOLECULAR CONFIRMATION OF THE PHENOTYPICAL IDENTIFICATION
OF CLINICAL STRAINS OF NON-ALBICANS YEASTS

Thessaloniki, June 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: **Τιμολέων –Αχιλλέας Βυζαντιάδης**, αναπληρωτής
καθηγητής Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: **Μόσιαλος Δημήτριος**, επίκουρος καθηγητής
Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, ΤΒΒ, Π.Θ

ΤΡΙΤΟ ΜΕΛΟΣ: **Καρπούζας Δημήτριος**, καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, ΤΒΒ, Π.Θ

To the person I am yet to become ,
the one who is rising everyday to
finally meet her higher self.

**Do what you feel in your heart to be right,
for you'll be criticized anyway**

-Eleanor Roosevelt

Περίληψη

Είναι γνωστό ότι στη σύγχρονη εποχή, οι λοιμώξεις, και κυρίως οι ενδονοσοκομειακές, ολοένα και αυξάνονται. Διάφοροι ιατρογενείς παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν σε αυτό, όπως η ευρεία χρήση αντιβιοτικών και αντιμυκητιακών, οι καθετήρες (καθώς είναι υλικά που ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών στις επιφάνειες τους), αλλά και η παρουσία ανοσοκατεσταλμένων ασθενών.

Ένα από τα πιο συχνά είδη που προκαλούν μυκητιάσεις είναι η *C. albicans*. Ωστόσο, συνεχώς αυξάνονται οι περιπτώσεις όπου υπάρχουν λοιμώξεις από είδη *non albicans*, όπως *Candida glabrata* και *Candida parapsilosis* ή άλλων ζυμομυκήτων. Είναι απαραίτητο να γίνει σωστή ταυτοποίηση του μύκητα που προκαλεί την λοίμωξη, ώστε να εφαρμοστεί η σωστή θεραπεία. Εξαιτίας όμως της δυσκολίας διάκρισης στελεχών που μοιάζουνε φαινοτυπικά και επειδή τα συστήματα αυτοματοποιημένης ταυτοποίησης δεν μπορούν να τα διακρίνουν πάντα σωστά, γίνεται κατανοητό ότι πρέπει κάποιες φορές να υπάρχει διαθέσιμη και μια επιβεβαιωτική μεθοδολογία, συχνά μοριακής ταυτοποίησης.

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας επιχειρήθηκε η επιβεβαίωση, με μοριακές μεθόδους, της φαινοτυπικής-βιοχημικής ταυτοποίησης διαφόρων στελεχών ζυμομυκήτων *non-albicans*, που είχε πραγματοποιηθεί νωρίτερα. Η επιβεβαίωση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω PCR (polymerase chain reaction), με την ενίσχυση και αλληλούχιση των περιοχών ITS1 και ITS2 του rDNA των μυκήτων. Με αυτόν τον τρόπο έγινε έλεγχος με αφορμή την πιθανή ανακάλυψη του αναδυόμενου μύκητα *C.auris* μεταξύ των δειγμάτων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μοριακή ταυτοποίηση, φαινοτυπική ταυτοποίηση, PCR, *Candida kefyr*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida uillermonti*, *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida lipolytica*, *Trichosporon asahii*,

ABSTRACT

It is known that infections, and especially the nosocomial ones, are increasing. Various iatrogenic factors may contribute to it, as the broad use of antibiotics and antifungal agents, the catheters (as they are materials that favor the development of microorganisms on their surfaces), but also the presence of immunocompromised patients.

One of the most often occurring types of fungus is *C. albicans*. However, there are constantly increasing cases where there are *non-albicans* infections, such as *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* or other yeasts. It is necessary to properly identify the fungus that causes the infection to apply the correct treatment. However, due to the difficulty of distinguishing strains that looked phenotypically similar and because automated identification systems cannot always properly distinguish them, it is understood that sometimes a confirmatory methodology, usually on the spectrum of molecular identification must sometimes be available.

In the present dissertation, molecular confirmation was attempted by using molecular methods in various non-albicans yeast strains, in which earlier phenotypic-biochemical identification had previously been executed. This confirmation was done using PCR (polymerase chain reaction), by amplifying and sequencing the ITS1 and ITS2 rDNA regions of the yeasts. This study was prompted by the possibility of discovering the emerging fungal pathogen *C. auris* among the other samples.

KEYWORDS: Molecular identification, phenotypic identification, PCR, *Candida kefyr*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida lipolytica*, *Trichosporon* *asahii*

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
A.1. Μύκητες και Μυκητιάσεις	8
A.2. Εργαστηριακή Διάγνωση Μυκητιάσεων	11
A.2.1. Φαινοτυπική Αναγνώριση	12
A.2.1.1. CHROMagar Candida Medium	12
A.2.1.2. ID 32 C	13
A.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	13
A.3.Σκοπός εργαστηριακής μελέτης	15
A.4. Στελέχη Μυκητών	15
A.4.1.Candida kefyr.....	15
A.4.2.Candida parapsilosis.....	17
A.4.3.Saccharomyces cerevisiae	19
A.4.4.Candida guilliermondi.....	21
A.4.5.Candida famata.....	23
A.4.6.Candida krusei	24
A.4.7. Candida lusitaniae	25
A.4.8. Candida lipolytica	26
A.4.9.Trichosporon asahii	28
A.5. BLAST / ISHAM.....	29
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
B.1. ΥΛΙΚΑ.....	31
B.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	31
B.2.1. Ανάπτυξη μυκήτων	31
B.2.2. Εκχύλιση με μέθοδο θερμαινόμενης πλάκας.....	32
B.2.3. PCR	33
B.2.4. Αλληλούχιση DNA	34
B.2.5. BLAST/ ISHAM.....	34
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35

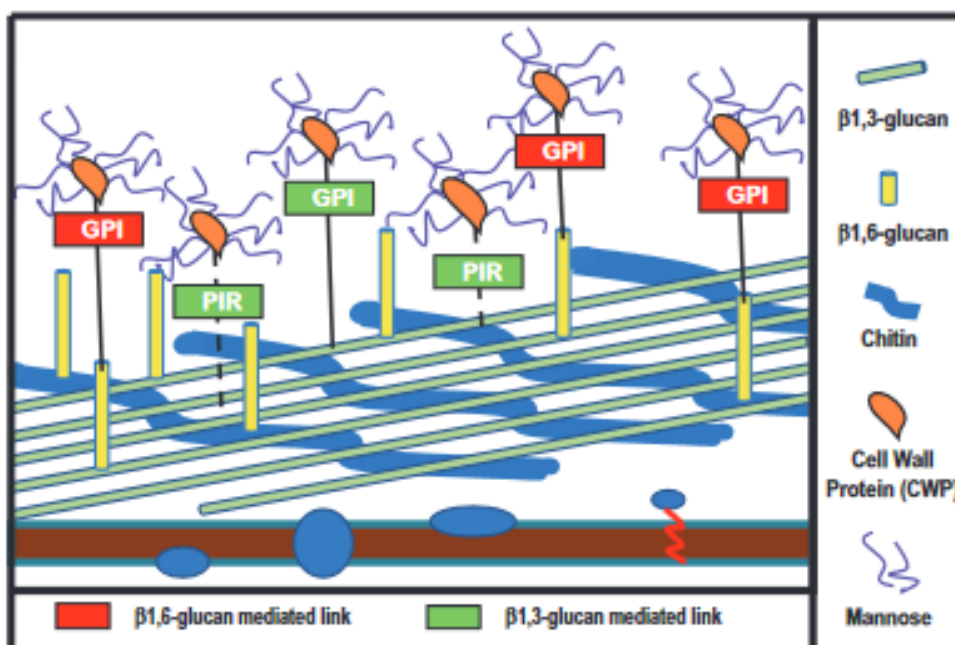
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
Βιβλιογραφία	46

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Μύκητες και Μυκητιάσεις

Οι μύκητες είναι μια γενικότερη ομάδα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, όπως τα μανιτάρια, οι ζύμες και οι νηματοειδείς μύκητες. Χαρακτηριστικό της ομάδας αυτής είναι η παρουσία της χιτίνης στα κυτταρικά τοιχώματα. Εκτός αυτής, μια ποικιλία γλυκανών, συμπεριλαμβανομένων των β -1,3-γλυκανών και των α -1,3-γλυκανών, υπάρχουν στο τοίχωμα των μυκητιακών κυττάρων. Αυτές οι γλυκάνες συντίθενται από συνθάσες γλυκάνης, οι οποίες εξωθούνται κατά την σύνθεσή τους μέσω της μεμβράνης πλάσματος στον χώρο του κυτταρικού τοιχώματος (Free, 2013). Η χιτίνη αντίστοιχα συντίθενται από μια συνθετάση της πλασματικής μεμβράνης και εξάγεται στο χώρο του κυτταρικού τοιχώματος ως γραμμικό πολυμερές (Bowman and Free, 2006).



Εικόνα 1 Σχηματική οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος μυκήτων. Τα κύρια δομικά συστατικά που φαίνονται είναι η β -1,3-γλυκάνη και χιτίνη, που βρίσκονται στο εσωτερικό. Το εξωτερικό στρώμα αποτελείται από πρωτεΐνες του κυτταρικού

τοιχώματος-cell wall proteins (CWPs) που συνδέονται με την εσωτερική πλευρά με <<άγκυρες>> γλυκοζυλοφωσφατιδυλοοσιτόλης (GPI) ή με εσωτερικούς επαναλαμβανόμενους δεσμούς – internal RepeatDomains (PIR) (Arana et al., 2009).

Μερικοί μύκητες είναι βρώσιμοι ενώ άλλοι τύποι, όπως ο *Aspergillus*, μπορούν να αποβούν επικίνδυνοι και να οδηγήσουν σε απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις (Krijgsheld et al., 2013). Οι μυκητιάσεις είναι λοιμώξεις που προκαλούνται από μύκητες σε διάφορα σημεία του ανθρώπινου σώματος.

Οι παθογόνοι μύκητες μοιάζουν κυτταρικά με τους φυτικούς και τους ζωικούς οικοδεσπότες τους, οπότε η εύρεση αντιμυκητιακών παραγόντων για τη θεραπεία των μυκητιακών λοιμώξεων είναι ένα δύσκολο έργο. Παρόλα αυτά, το τοίχωμα αυτών των κυττάρων είναι μοναδικό για κάθε παθογόνο και έχει γίνει στόχος για την ανάπτυξη αντιμυκητιακών παραγόντων (Free, 2013).

Οι λοιμώξεις αυτές αντιπροσωπεύουν σήμερα ένα σοβαρό πρόβλημα. Οι τεχνολογίες που παρατείνουν τη ζωή, η θεραπεία πριν από τη μεταμόσχευση οργάνων, τα αντικαρκινικά φάρμακα, και η χρήση αντιβιοτικών ευρέων φάσματος (Silva et al., 2012) έχουν δώσει τη δυνατότητα στους μύκητες να αναπτύσσονται και να προκαλούν ασθένειες (Arana et al., 2009). Σε αυτό συμβάλλει συχνά και η ανοσοκαταστολή, καθώς η χημειοθεραπεία εξασθενεί το ανοσοποιητικό σύστημα (Neofytos et al., 2013). Τέτοιες λοιμώξεις μπορεί είτε να είναι επιφανειακές, επηρεάζοντας το δέρμα, τα μαλλιά, τα νύχια και τους βλεννογόνους, ή συστηματικές, επηρεάζοντας σημαντικά όργανα του σώματος (Silva et al., 2012).

Το επιθήλιο του εντέρου, με τις στενές διασταυρώσεις, διασυνδέοντας τα επιθηλιακά κύτταρα και με τον περιορισμό της διέλευσης των σωματιδίων και των μικροοργανισμών, αντιπροσωπεύει ένα στερεό ανατομικό φράγμα που αναστέλλει την μη ελεγχόμενη κίνηση μικροοργανισμών. Υπάρχουν τρεις κύριες παθοφυσιολογικές ομάδες όπου η αποτυχία του φράγματος του εντέρου μπορεί να παρατηρηθεί σίγουρα, δηλαδή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε κοιλιακή χειρουργική επέμβαση, σε βαρέως πάσχοντες που έχουν για παράδειγμα καρκίνο, ασθενείς που πάσχουν από βλεννογονίτιδα μετά από κυτταροστατική θεραπεία και σε ασθενείς με χρόνιες παθολογικές καταστάσεις όπως λοίμωξη από HIV, κίρρωση ήπατος ή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Hof, 2019). Ενώ οι επιφανειακές λοιμώξεις από τα δερματόφυτα είναι σχετικά απλές στην καταπολέμηση και όχι απειλητικές για

τη ζωή, η αντιμετώπιση της βαθιάς διεισδυτικής μυκητίασης είναι πιο περίπλοκη και οι διαθέσιμες θεραπείες είναι περιορισμένες (Arana *et al.*, 2009).

Είναι κατανοητό επομένως ότι ο ταυτοποιητικός προσδιορισμός των στελεχών είναι πρωταρχικής σημασίας για την καταπολέμηση της λοίμωξης. Υπάρχει ένα μεγάλο πλήθος μυκητιακών ειδών που είναι συσχετιζόμενα με ανθρώπινες ασθένειες. Η *Candida albicans* είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος μύκητας που συναντάται σε κλινικά δείγματα, κυρίως λόγω της θέσης του, καθώς αυτός ο μύκητας κατοικεί στο ανθρώπινο γαστρεντερικό και ουρογεννητικό σωλήνα (Chowet *et al.*, 2008; Grubb *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012). Η μερική ικανότητα αυτού του μύκητα να τροποποιεί τη μορφολογία του, από μια μορφή που μοιάζει με ζυμομύκητα σε μια περισσότερο νηματοειδή μορφή, ρυθμίζεται από τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά με παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH ή τα θρεπτικά συστατικά που το περιβάλλουν (Arana *et al.*, 2009).

Ωστόσο, κατά την μείωση της άμυνας του ξενιστή, η *Candida albicans* μέσα στο ανθρώπινο σώμα μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση στο εσωτερικό των οργάνων και να προκαλέσει σοβαρές καντιντιάσεις. Τα φαγοκύτταρα, ιδιαίτερα τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, φαίνεται να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην άμυνα του ξενιστή έναντι συστημικών λοιμώξεων και κατά συνέπεια, η πλειοψηφία των λοιμώξεων εμφανίζεται σε ασθενείς με ουδετεροπενία ή έλλειμιαστη λειτουργία των ουδετερόφιλων ή των μακροφάγων (Grubb *et al.*, 2008).

Αν και η *C. albicans* είναι από τα πιο διαδεδομένα είδη που εμπλέκονται σε μυκητιακές λοιμώξεις (ειδικά μετά από επεμβάσεις), η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων λόγω *non-albicans* ειδών αυξάνεται. Έρευνες δείχνουν ότι εκτός από το πρώτο, πιο συχνά βρίσκονται μυκητιάσεις που οφείλονται σε *C. glabrata* και λιγότερο σε άλλα *non-albicans* είδη. Αυτή η αλλαγή στην επιδημιολογία θα μπορούσε να συσχετιστεί με έκθεση σε αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και την ηλικία των ασθενών. Επίσης, σημασία παίζει και η γεωγραφική περιοχή, καθώς σε ευρωπαϊκές χώρες, μια ανάλυση έδειξε ότι περισσότερο από το ήμισυ των περιπτώσεων της καντιντίας, προκλήθηκαν από *C. albicans* και τα ποσοστά για τους *non-albicans*, ήταν 14% και για την *C. glabrata* και για την *C. parapsilosis*, 7% για την *C. Tropicalis* και 2% για την *C. krusei*, ενώ αντίστοιχα σε λατινικές χώρες, όπως η Χιλή, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στα επιδημιολογικά αυτά δεδομένα. Το πιο συχνό είδος είναι η *C. parapsilosis*, ακολουθούμενο από την *C. tropicalis* και την *C. glabrata* (Sardi *et al.*, 2013).

Γενικώς πάντως, τα στελέχη *Candida* είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ομάδα μυκητιακών οργανισμών που μπορούν όλα να αναπτυχθούν με μορφολογία ζύμης. Μακροσκοπικά, οι αποικίες *Candida*, στο σύνηθες χρησιμοποιούμενο μέσο ανάπτυξης με πεπτόνες, άγαρ Sabouraud dextrose (SDA), έχουν χρώμα κρεμ προς κίτρινο. Ανάλογα με το είδος, η υφή της αποικίας μπορεί να είναι ομαλή, λαμπερή ή ξερή, ή με πτυχές και θαμπή. Με βέλτιστα θρεπτικά συστατικά και υπό πρότυπες συνθήκες, μεγαλώνουν στην εκθετική φάση ως βλαστοκονίδια, που έχουν οβάλ σχήμα και μέγεθος περίπου 2-5 mm επί 3-7 mm (Walsh, Hayden and Larone, 2018). Ορισμένα είδη, όπως η *Candida dubliniensis* και άλλα, μπορούν να αναπτυχθούν με νηματοειδή τρόπο, δηλαδή με υφές ή πιο συχνά, με ψευδοϋφές (Silva *et al.*, 2012).

A.2. Εργαστηριακή Διάγνωση Μυκητιάσεων

Είναι απαραίτητο να γίνεται ταυτοποίηση στο επίπεδο του είδους ή του γένους των ιατρικά σημαντικών μυκήτων. Με αυτόν τον τρόπο ακολουθείται σωστή θεραπεία, αλλά είναι δυνατή και η κατανόηση της παθογένειας και η εξέλιξη της λοίμωξης, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι η καλλιέργεια τους και ύπαρξη τους σε κλινικά δείγματα ταυτίζεται πάντα με την εμφάνιση νόσου (Τ.Α. Βυζαντιάδης, 2019).

Η ταυτοποίηση συνήθως γίνεται φαινοτυπικά, με μορφολογικά κριτήρια και κυρίως για τους νηματοειδείς μύκητες. Αυτό καθίσταται ολοένα και πιο δύσκολο, διότι αποδεικνύεται ότι σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν «κρυφά» είδη μεταξύ μορφολογικά πανομοιότυπων στελεχών. Υπάρχουν όμως και αυτοματοποιημένα συστήματα ταυτοποίησης, με βάση ενζυμικές αντιδράσεις και αφομοίωση υδατανθράκων που δίνουν οριστική επιβεβαίωση των ειδών των ζυμομυκήτων, γεγονός που διευκολύνει την διαδικασία.

Συχνά όμως, συμπληρωματικά αξιοποιούνται και μοριακές μέθοδοι, για να γίνει και πιο γρήγορα και αξιόπιστα η αξιολόγηση των κλινικών δειγμάτων. Παρόλο που είναι ακριβή η μοριακή αναγνώριση, κρίνεται π.χ συχνά απαραίτητο να γίνει η αναγνώριση των ενδογενώς ανθεκτικών στελεχών από τα ευαίσθητα στα αντιμυκητιακά και για να προβλεφθεί η κατάλληλη αγωγή. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.

A.2.1. Φαινοτυπική Αναγνώριση

Τα διάφορα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα βιοχημικής-ενζυμικής φαινοτυπικής ταυτοποίησης, είναι εύκολα για χρήση. Απαιτείται όμως κανονικά μια επώαση από 24 έως 48 ώρες πριν από την πραγματοποίηση των βιοχημικών αντιδράσεων. Εκτός από τις δοκιμασίες που περιέχονται σε αυτά τα κιτ, συχνά απαιτούνται συμπληρωματικές δοκιμές πριν την τελική επιβεβαίωση. Ενώ αυτά τα προϊόντα είναι αποτελεσματικά για την εύρεση των κοινώς εμφανιζόμενων μυκήτων, η εφαρμογή τους είναι κάπως πιο περιορισμένη για τον προσδιορισμό λιγότερο συχνών μικροοργανισμών (Shiang *et al.*, 2007).

Παραδείγματα φαινοτυπικών δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη:

A.2.1.1. CHROMagar Candida Medium

Το CHROMagar Candida Medium είναι ένα χρωμογόνο μέσο καλλιέργειας που διευκολύνει την απομόνωση και την αναγνώριση των κυριότερων ειδών *Candida* λόγω διαφορετικού χρωματισμού. Υπάρχουν αρκετές αποικίες μαγιάς που παράγουν ασυνήθιστα σκούρες πράσινες χρωματιστές αποικίες στο μέσο CHROMagar Candida σε σύγκριση με το αναμενόμενο ανοιχτό πράσινο χρώμα που έχουν οι *Candida albicans* (Schoof *et al.*, 1997).

Το CHROMagar Candida Medium (CHROMagar Micro-Biology, Paris, France) ενσωματώνει ένα υπόστρωμα της β-N-ακετυλεξοσαμινιδάσης (b-N-acetylhexosaminidase) και μία φωσφατάση. Αυτό το μέσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της *C. albicans* (κίτρινο-πράσινες προς μπλε πράσινες αποικίες), *C. krusei* (ανοιχτό ροζ προς μοβ, τραχιές αποικίες), και *C. tropicalis* (σκούρο μπλε προς μπλε-γκρι αποικίες, με σκούρο δακτύλιο στο άγαρ) (Pincus, Orenga and Chatellier, 2007).

Η απόδοση του CHROMagar Candida ήταν καλύτερη με αποστειρωμένο δείγμα σε σχέση με μη αποστειρωμένο. Συνεπώς, ο ρόλος του ως αρχικό μέσο απομόνωσης για τη βελτίωση του εντοπισμού μυκήτων είναι περιορισμένος. Το CHROMAGAR Candida (CHROMAGAR MICRO-BIOLOGY), οι αποικίες ήταν συνήθως αρκετά μικρές και χρωμάτων undefined μετά από ολονύκτια επώαση. Επομένως, συνιστάται

να παρατηρηθούν τα χρώματα μετά από 48 ώρες επώασης (Pincus, Orenga and Chatellier, 2007).

A.2.1.2. ID 32 C

Το ID 32 C είναι ένα τυποποιημένο σύστημα για την ταυτοποίηση μυκήτων, το οποίο χρησιμοποιεί 32 μικροσκοπικές δοκιμές αφομοίωσης και μια βάση δεδομένων. Η ανάγνωση και η ερμηνεία πραγματοποιούνται αυτόματα ή χειροκίνητα. Η λωρίδα του τεστ ID 32C αποτελείται από 32 βοηθία, που το καθένα περιέχει ένα αφυδατωμένο υπόστρωμα υδατανθράκων. Ένα ημι-στερεό μέσο εμβολιάζεται με ένα εναιώρημα του οργανισμού ζύμης που πρέπει να δοκιμαστεί. Μετά από 24-48 ώρες επώασης, η ανάπτυξη σε κάθε θέση διαβάζεται, είτε σε συσκευή είτε οπτικά. Η αναγνώριση επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό αναγνώρισης ('Id 32 C', 2001).

A.2.2.Μοριακή ταυτοποίηση

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η τεχνολογία που έχει αναμφισβήτητα τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στην κλινική διάγνωση των λοιμώξεων των *Candida* είναι η PCR. Αυτή η τεχνική μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές ποσότητες μικροβιακού νουκλεϊκού οξέος από το αίμα και τα δείγματα ιστών. Στην PCR, ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ομόλογο σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, χρησιμεύει για να προκαλέσει την ενίσχυση του στόχου DNA. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των εκκινητών PCR που χρησιμοποιούνται απευθείας σε κλινικά δείγματα είναι ότι είναι συγκεκριμένοι και δεν ενισχύουν το DNA του ξενιστή ή άλλων μικροοργανισμών (Silva *et al.*, 2012).

Η ανάγκη για πρωτόκολλα στη μυκητολογία είναι σαφής, καθώς ο μεγάλος αριθμός των μυκήτων, σε συνδυασμό με τους περιορισμούς των κλασσικών μεθοδολογιών, και την επακόλουθη ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου προσωπικού σε αυτές, μαζί με την δυσκολία αντιμετώπισης των σχετικών λοιμώξεων, ενισχύει την προσπάθεια για μοριακές προσεγγίσεις στους μύκητες, για να διευκολυνθεί και να γίνει πιο εύκολη και ευαίσθητη η ανίχνευση και η ταυτοποίηση τους. Μια από τις περιοχές DNA που

αξιοποιείται για αυτό τον σκοπό, είναι η εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή της ριβοσωμικής μονάδας (internal transcribed spacer- ITS) (Nilsson *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με τους Blaaid *et al.* (2013), η περιοχή αυτή είναι μια περιοχή DNA που χρησιμοποιείται για τη μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων και πρόκειται για τον πιο δημοφιλή τρόπο για τις μυκητολογικές μελέτες. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες των μυκήτων, γεγονός που έχει οδηγήσει σε συσσώρευση εκατοντάδων χιλιάδων αλληλουχιών στις διεθνείς βάσεις δεδομένων αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (INSS: GENBANK, ENA και DDBJ). Για να βελτιωθεί η ευαισθησία της PCR, πολλοί ερευνητές έχουν σχεδιάσει εκκινητές που ενισχύουν τις περιοχές του DNA που επαναλαμβάνονται στο μυκητιακό γονιδίωμα. Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος στόχος για τους διαγνωστικούς εκκινητές είναι το οπερόνιο του γονιδίου rRNA, που κωδικοποιεί τις υπομονάδες γονιδίων 18S, 5.8S και 28 S RNA, δηλαδή τις περιοχές ITS1, ITS2 και ITS4 (Silva *et al.*, 2012).



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση των θέσεων των ITS1, ITS2 στο οπερόνιο των γονιδίων 18S, 5,8s και 28s rRNA (Dyomin *et al.*, 2017)

Η έκταση της περιοχής σε μήκος, που μελετάται συνήθως, ποικίλλει μεταξύ περίπου 450 και 750 ζευγών βάσεων και αποτελείται από τις τρεις υποπεριοχές, τις ITS1, ITS2 και το γονίδιο 5.8S. Το γονίδιο 5.8S είναι ιδιαίτερα σταθερό, ενώ τα ITS1 και ITS2 είναι διαφορετικά και παρέχουν πληροφορίες τόσο σε σχέση με το γένος, αλλά και συχνά στο επίπεδο εντός των ειδών (Blaaid *et al.*, 2013). Το μήκος της αλληλουχίας ITS είναι εξαιρετικά μεταβλητό από το ένα μυκητιακό είδος στο άλλο και εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται για να στοχεύσουν την αλληλουχία DNA (Mbarche *et al.*, 2020). Παρόλο που η περιοχή του θεωρείται ως μυκητιακό Barcode, στερείται της απαραίτητης εξειδίκευσης σε ορισμένες ομάδες, όπως *Fusarium* και *Aspergillus*, οπότε άλλοι ή πρόσθετοι δείκτες είναι απαραίτητοι (Blaaid *et al.*, 2013).

A.3. Σκοπός εργαστηριακής μελέτης

Η παρούσα εργαστηριακή μελέτη διεξήχθη με αφορμή τον έλεγχο παλαιότερων κλινικών δειγμάτων που έχουν προηγουμένως ταυτοποιηθεί φαινοτυπικά ως άλλα είδη μυκήτων, για πιθανή ύπαρξη *Candida auris*. Η *C.auris* αποτελεί έναν αναδυόμενο μύκητα με υψηλή ανθεκτικότητα σε ευρύ φάσμα αντιμυκητιακών φαρμάκων, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει διεισδυτικές λοιμώξεις και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θανάτου (Kordalewska et. al, 2017).

Έχουν αναφερθεί παγκοσμίως ποικίλες εργαστηριακές περιπτώσεις όπου μέσω εμπορικών φαινοτυπικών πλατφορμών ταυτοποίησης μυκήτων η *C.auris* έχει εσφαλμένα ταυτοποιηθεί ως άλλο είδος μύκητα , όπως *C.famata*, *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae*, *C.parapsilosis*, *S.cerevisiae* κ.α (Centers for Disease Control and Prevention, 2016 ; Mizusawa et. al, 2017 ; Britz E, Govender NP.,2016).

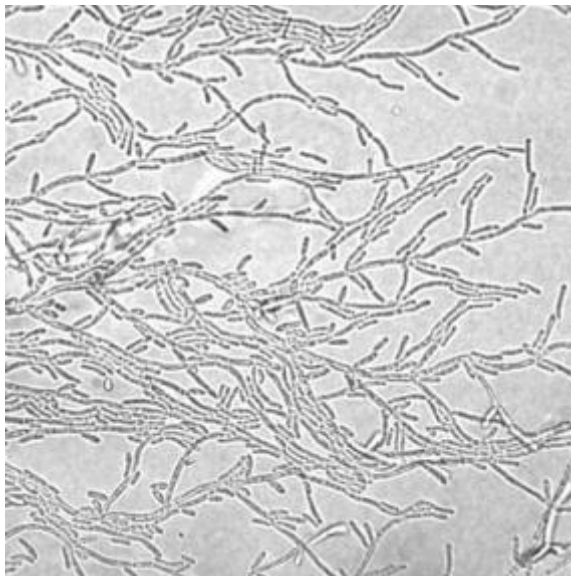
Θεωρήθηκε συνεπώς εργαστηριακά ενδιαφέρονσα η πειραματική μελέτη για έλεγχο της πιθανότητας ύπαρξης μιας παρόμοιας περίπτωσης εσφαλμένης ταυτοποίησης.

A.4. Στελέχη Ζυμομυκητών

A.4.1. *Candida kefyr*

Σύμφωνα με τους (Halawi et al., 2020) η *Candida kefyr*, που ονομάζεται πλέον *Kluyveromyces Marxianus* και είναι γνωστή ως βιομηχανική μαγιά, βρίσκεται στο γάλα και το Κεφίρ, αλλά και σε άλλα μη γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως η σοκολάτα και η τεκίλα. Έχει άλλα συνώνυμα υποείδη και ασεξουαλικές μορφές *Kluyveromyces fragilis*, *K. bulgaricus*, *C. pseudotropicalis* και *K. lactis*.

Στα κύρια μέσα ανάπτυξης, τα κύτταρα είναι στρογγυλά προς ωοειδή με διαστάσεις $3-8 \times 5-12 \mu\text{m}$. Σε άγαρ αραβοσίτου-Tween 80 στους 25°C για 72 ώρες, η *C. kefyr* σχηματίζει ψευδοϋφές με επιμήκη βλαστοκονίδια που χαρακτηριστικά τοποθετούνται παράλληλα. (Walsh, Hayden and Larone, 2018).



Εικόνα 3 *C. kefyr* σε άγαρ αραβοσίτου-Tween 80 (Walsh, Hayden and Larone, 2018)

Η *Candida kefyr* είναι ένα ευκαιριακό είδος που μπορεί να απομονωθεί από επιφανειακές και διεισδυτικές λοιμώξεις στους ανθρώπους. Έχει αναγνωριστεί ως παθογόνο που προκαλεί οισοφαγίτιδα σε ανοσοκατεσταλμένους, καθώς έχει απομονωθεί από καλλιέργειες αίματος, ενώ υπάρχει περίπτωση να είναι υπεύθυνη για μυκητιακή εντερίτιδα, που διαγνώστηκε τόσο ιστολογικά όσο και με την αλληλούχιση νουκλεϊκού οξέος (Direkzeet *al.*, 2012). Η *C. kefyr* πάντως φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις λοιμώξεις των ουδετεροπενικών ασθενών και έχει απομονωθεί από τη στοματική κοιλότητα ασθενών με καρκίνο (Halawi *etal.*, 2020). Η *C. Kefyr* παραμένει μια σπάνια αιτία ασθένειας (Dufresneet *al.*, 2014).



Εικόνα 4. *Candida kefyr* σε SDA(Halawietal., 2020)

Τέλος, η *C. kefyr* είναι ευαίσθητη σε αντιμυκητιακά, με τα περισσότερα στελέχη της να είναι ευαίσθητα στην αμφοτερικίνη B, τη φλουконаζόλη, τη νιτρακοναζόλη, κετοконаζόλη, μικοναζόλη και βορικοναζόλη (Johnson, 2009).

A.4.2. *Candida parapsilosis*

Οι *Candida parapsilosis* εμφανίζονται ως οβάλ, στρογγυλά ή με κυλινδρικά σχήματα μεγέθους (2,5–4 × 3–8 μm) (Walsh, Hayden and Larone, 2018). Όταν καλλιεργούνται σε άγαρ Sabouraud Dextrose, οι αποικίες είναι λευκές, κρεμώδεις, λαμπερές, λείες ή με πτυχές. Σε αντίθεση με το *C. albicans* και *C. tropicalis*, που μπορούν να υπάρχουν σε πολυμορφογενετικές μορφές, το *C. parapsilosis* δεν σχηματίζει πραγματικές υφές αλλά ψευδοϋφές (Trofa, Gácsér and Nosanchuk, 2008). Τέτοια μορφή έχει παρατηρηθεί σε άγαρ αραβοσίτου και μπορεί να αναγνωριστεί με μικροσκοπία φωτός (Walsh, Hayden and Larone, 2018). Ο σχηματισμός ψευδοϋφών συνδέεται με ένα σύνολο αμινοξέων, ιδιαίτερα της κιτροουλίνης, που προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία της αποικίας. Η μορφή των αποικιών εξαρτάται επίσης από τη μορφή των κυττάρων, δηλαδή οι αποικίες ζύμης εμφανίζουν ομαλές ή σανμορφές κρατήρα, ενώ στις ψευδοϋφές παρουσιάζονται ομόκεντρες μορφές (Trofa, Gácsér and Nosanchuk, 2008).



Εικόνα4 *C. Parapsilosis* σε Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Ge et al., 2019)

Η *C. parapsilosis* είχε διαχωριστεί σε τρεις ομάδες (I-III), αλλά εξαιτίας μελετών του γονιδιώματός της, τελικά διαχωρίστηκαν αυτές οι στενά συνδεδεμένες ομάδες, σε αλλά διακριτά είδη, δηλαδή, *C. parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* και *Candida metapsilosis* (Silva et al., 2012).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, η συχνότητα εμφάνισης των *Candida parapsilosis* αυξάνεται δραματικά. Οι αναφορές δείχνουν ότι είναι το δεύτερο πιο συχνά απομονωμένο είδος από καλλιέργειες αίματος ενώ σε πολλές περιπτώσεις ξεπερνάει ακόμη και την εμφάνιση του *C. albicans* σε κάποια Ευρωπαϊκά, Ασιατικά και νοσοκομεία της Λατινικής Αμερικής (Trofa, Gácsér and Nosanchuk, 2008).

Η *Candida parapsilosis* συνήθως βρίσκεται στο ανθρώπινο δέρμα και η παθογονικότητά του περιορίζεται εξαιτίας του άθικτουδέρματος. Είναι γνωστό για την ικανότητά του να αναπτυχθεί όταν γίνεται παρεντερική διατροφή και σχηματίζει βιοφίλμ σε καθετήρες και άλλες εμφυτευμένες συσκευές. Ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι η *C.parapsilosis* προκαλεί περισσότερο από το ένα τέταρτο όλων των διεισδυτικώνμυκητιάσεωνσε νεογνά στο Ηνωμένο Βασίλειο και μέχρι το ένα τρίτο των λοιμώξεων στη Βόρεια Αμερική. Επιπλέον, είναι ο κυρίαρχος μυκητιακός οργανισμός που απομονώνεται σε νεογνικές μονάδες εντατικής θεραπείας και συχνά

συνδέεται με περιστατικά νεογνικής θνησιμότητας (Trofa, Gácsér and Nosanchuk, 2008).

Η παθογένεια της διεισδυτικής καντιντίασης, και γενικώς των λοιμώξεων, όπως η ενδοκαρδίτιδα, η μηνιγγίτιδα και η περιτονίτιδα, εξαρτάται από παράγοντες μολυσματικότητας όπως την ικανότητα να προσκολληθούν οι μύκητες σε κύτταρα του ξενιστή και επιφάνειες βλεννογόνου, τον σχηματισμό βιοφίλμ καθώς και από την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων, όπως πρωτεάσες, φωσφολιπάσες και λιπάσες (Krcmery and Barnes, 2002).

A.4.3. Saccharomyces cerevisiae

Η μαγιά *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας μύκητας που κατατάσσεται στους ασκομύκητες (Ascomycota). Οι ασκομύκητες είναι μια συνομοταξία του βασιλείου των μυκήτων που, μαζί με τους Βασιδιομύκητες, σχηματίζει το υποβασίλειο των Δικάρυων (Dikarya) και πρόκειται για τη μεγαλύτερη συνομοταξία καθώς αποτελούν σχεδόν το 75% όλων των περιγραφέντων μυκήτων (Trail, 2007). Το μέγεθος των κυττάρων του ζυμομύκητα είναι 2-10 μm, παρατηρούνται εύκολα με οπτικά μικροσκόπια (Bui, Kim and Choi, 2008) και έχουν ένα σχετικά απλό, ελλειψοειδές, σχήμα (Saito *et al.*, 2004). Πρόκειται για μια διμορφική ζύμη που ποικίλλει, μεταξύ μιας μυκητιακής και μιας νηματοειδούς μορφής ανάπτυξης. Επιπλέον, ο *S. Cerevisiae* είναι ικανός να μεταβεί από τη μυκητιακή σε νηματοειδή μορφή με επιμήκη κύτταρα, επηρεάζοντας την ανάπτυξη της αποικίας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρών ψευδοϋφών (Casalone *et al.*, 2005; Walsh, Hayden and Larone, 2018). Οι αποικίες συνήθως είναι λευκές, ομαλές, γυαλιστερές αλλά οι κυτταρικές μορφολογίες των φυσικών και βιομηχανικών πληθυσμών των στελεχών *S. cerevisiae* ποικίλλουν ανάλογα με τα διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Στη βιομηχανία, φαίνεται ότι τα στελέχη που παρουσιάζουν τραχείες αποικίες και ψευδοϋφική μορφολογία συνδέονται συχνά με διαταραχές στη διαδικασία ζύμωσης, το σύστημα ζύμωσης και άλλες λειτουργικές ρυθμίσεις (Reiset *et al.*, 2013).

Ο μύκητας *S. cerevisiae* είναι γνωστός ως ζύμη αρτοποιίας και ζυθοποιίας. Στον άνθρωπο απαντάται στο έντερο αλλά προέρχεται από τρόφιμα. Δε θεωρείται ενδημικός οργανισμός, ενώ η "άγρια" του μορφή συνδέεται με τα φυτά. Ωστόσο, η ικανότητα των στελεχών να αναπτυχθούν στους 37°C και η συχνή κατανάλωση, το

καθιστούν μεταξύ των πιο συχνά εντοπισμένων μυκήτων σε δείγματα κοπράνων και πιθανότατα συμβάλλει στη μικροβιακή οικολογία του εντέρου (Hallen-Adams and Suhr, 2017).



Εικόνα 5. *Saccharomyces cerevisiae* (Bernstein, 2018)

Σύμφωνα με τους Harris Bernstein και Carol Bernstein, τα κύτταρα *S. cerevisiae* υπάρχουν στη φύση ως απλοειδή (N) ή διπλοειδή (2N). Τα απλοειδή φυτικά κύτταρα μπορούν να αναπαραχθούν με μίτωση υπό ευνοϊκές συνθήκες. Τα διπλοειδή κύτταρα μπορούν επίσης να αναπαραχθούν με μίτωση, όταν οι θρεπτικές ουσίες είναι άφθονες. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία και δεν αναπαράγονται, υποβάλλονται σε γήρανση, συσσωρεύοντας σπασμένα μόρια DNA και η ικανότητά τους να επιδιορθώνουν τέτοιες ζημιές μειώνεται. Όταν λιμοκτονούν, τα απλοειδή κύτταρα μπορούν να ζευγαρώσουν για να σχηματίσουν διπλοειδή κύτταρα που μπορούν να διαιρεθούν με μείωση, για να παράγουν τέσσερα απλοειδή σπόρια, που περιέχονται σε μια δομή που μοιάζει με ασκό (ascus.) Τέτοια σπόρια είναι ανθεκτικά στο στρες, αλλά υπό ευνοϊκές συνθήκες μπορούν να βλαστήσουν για να παράγουν απλοειδούς απογόνους με μίτωση (Bernstein, 2018).

Το τοίχωμα του *Saccharomyces cerevisiae* αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από τη β-D-γλυκάνη με μικρότερη ποσότητα 1,6-β-γλυκάνη (Lesage and Bussey, 2006). Περιέχει επίσης μια μικρή ποσότητα χιτίνης. Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος περιέχουν N-συνδεδεμένες εξωτερικές αλυσίδες, γραμμικών πολυμερών μαννόζης με

έως και 200 υπολείμματα, αλλά και μικρότερα Ο-συνδεδεμένα. Το τοίχωμα οργανώνεται έτσι ώστε οι γλυκάνες και η χιτίνη να είναι πιο συμπυκνωμένες στο τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος δίπλα στη μεμβράνη πλάσματος ενώ η εξωτερική επιφάνεια του τοιχώματος να περιέχει μεγάλες ποσότητες των πολυμερών μαννόζης και γλυκοπρωτεϊνών (Free, 2013).

Σύμφωνα με μια μελέτη, που αναφέρεται στην δημοσίευση των Bernstein et. Al (Bernstein, 2018), για την καταγωγή των στελεχών *S. cerevisiae*, φαίνεται στη φύση, ο συγκεκριμένος μύκητας σπάνια εμφανίζει καινούργια στελέχη και το ζευγάριωμα είναι συνήθως μεταξύ παρόμοιων κυττάρων.

Ο *S. cerevisiae* είναι ένας ανθρώπινος αποικιστής στους βλεννογόνους, μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας αλλά και παθογόνο. Μπορεί να βρεθεί και σε μη αποστειρωμένες (βλεννογόνο) και σε αποστειρωμένες (π.χ., αίμα) περιοχές του σώματος, τόσο στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όσο και στους ασθενείς με καλύτερη κλινική εικόνα. Έχουν παρόμοιους παράγοντες για εμφάνιση ασθενειών με τα είδη *Candida*, όπως η ανοσολογική ανεπάρκεια, θεραπεία με αντιβιοτικά και ενδοαγγειακούς καθετήρες. Τέλος, οι διεισδυτικές λοιμώξεις αυτού του στελέχους και η καντιντίαση είναι κλινικώς δυσδιάκριτες, οπότε η σωστή ταυτοποίηση του είδους είναι απαραίτητη για τη σωστή θεραπεία (Strope et al., 2015).

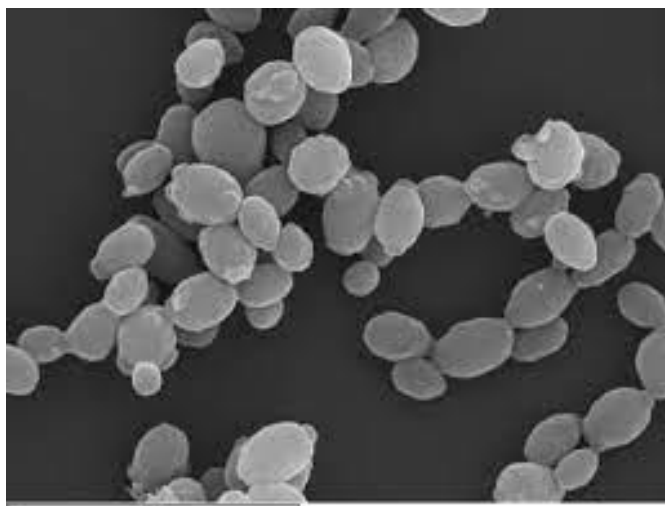
A.4.4. *Candida guilliermondii*

HC. guilliermondii είναι ένα φυσιολογικό συστατικό της ανθρώπινης μικροβιακής χλωρίδας και μπορεί επίσης να απομονωθεί από τρόφιμα και άλλες περιβαλλοντικές πηγές όπως η ατμόσφαιρα, το έδαφος, τα λαχανικά, τα έντομα, το θαλασσινό νερό (Paponet et al., 2013).

Η *C. guilliermondii* παρουσιάζει πολυάριθμες εφαρμογές στο βιοτεχνολογικό πεδίο που σχετίζονται με την ικανότητά του να υπερπαράγει ριβοφλαβίνη, να μετατρέπει την ξυλόζη σε ξυλιτόλη, για να αναπτυχθεί σε Ν-αλκάνια και να παράγει έναν αριθμό ενζύμων και αρωματικών ενώσεων. Η ριβοφλαβίνη χρησιμοποιείται συνήθως ως ζωοτροφή, ως κίτρινο χρωστικό σε ορισμένα ποτά καθώς και ως φάρμακο για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Αντίστοιχα, η ξυλιτόλη χρησιμοποιείται ως προσθετικό σε τρόφιμα για γλυκαντικό (Rosa et al., 1998; Papon et al., 2013).

Φαίνεται ότι έχει αντίσταση στην αμφοτερικίνη Β, τόσο κλινικά όσο και *in vitro*. Πρόκειται για ένα από τα είδη *Candida* που φαίνεται να προκαλούν μυκητιάσεις, αν και αυτό συμβαίνει σπάνια και εμπλέκεται σε χρόνιες ονυχομυκητιάσεις, οξεία οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα (Krcmery and Barnes, 2002; Girmenia *et al.*, 2006; Pfaller *et al.*, 2006).

Σύμφωνα με τους Walsh, Hayden and Larone (2018), στα συνήθη μέσα ανάπτυξης τα κύτταρα αυτά είναι ωοειδή προς επιμήκη (2-5×3-7 μm). Σε άγαρ αραβοσίτου-Tween 80 στους 25 ° C για 72 ώρες, η *C. guilliermondii* σχηματίζει συστάδες κυττάρων με σχετικά λίγες, μικρές ψευδοϋφές, έχοντας μικρές ομάδες βλαστοκονιδίων και δεν παράγονται αληθινές υφές. Οι αποικίες που σχηματίζει αυτό το είδος είναι επίπεδες, γυαλιστερές, λείες, και συνήθως χρώματος κρεμ, ενώ αποκτά πιο σκούρο ή ροζ με την ηλικία.

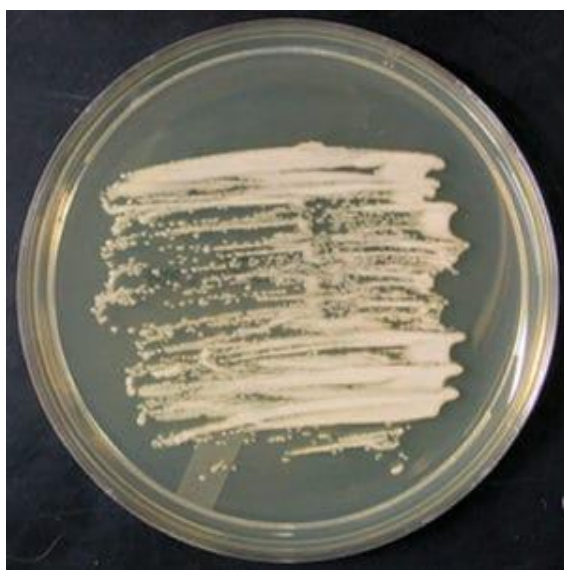


Εικόνα 6. Φωτογραφία από SEM της *C. guilliermondii*, μεγέθυνση 2000X (Marcos-Zambrano *et al.*, 2017)

Χαρακτηρίζεται ως <<flavinogenic yeast>> λόγω της ικανότητας της να υπερπαραγάγει ριβοφλαβίνη, χωρίς όμως να είναι το μοναδικό είδος. Σε αυτή την κατηγορία συγκαταλέγεται και η *C. famata* (Rosa *et al.*, 1998). Με δυσκολία φαινοτυπικά διαφοροποιείται η *C. Guilliermondii* από τη *C. famata* και συχνά γίνεται λάθος ταυτοποίηση, αν δεν χρησιμοποιούνται μοριακοί μέθοδοι (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008; Johnson, 2009).

A.4.5. *Candida famata*

Η *Candida famata* είναι ένας μύκητας που υπερπαράγει ριβοφλαβίνη, είδος που κατατάσσεται στους ασκομύκητες, με υψηλή αντοχή στην όσμωση. Απομονώνεται από πολλές πηγές, που σχετίζονται με την παραγωγή τροφίμων. Εντοπίζεται στις θηλές των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, σε διάφορους τύπους τυριών, γαρίδες, άγρια περιστέρια, άγρια πτηνά και albino αρουραίοι μεταξύ άλλων (Voronovsky *et al.*, 2002; Sanchez Betancourt *et al.*, 2016).



Εικόνα 7 Η *Candida famata* αναπτύσσεται γρήγορα σε μέσο ανάπτυξης με την παραγωγή αποικιών κρεμ χρώματος στους 25 ° C. Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 35° C έως 37 ° C. (<https://www.captodayonline.com/inside-the-color-atlas-of-mycology-candida-famata/>)

Η *C. famata* σχηματίζει λευκές προς κρεμ, ομαλές, λαμπερές αποικίες σε πλούσιο στερεό μέσο ανάπτυξης εκχυλίσματος ζυμομύκητα με πεπτόνη και δεξτρόζη (yeast extract peptone dextrose - YPD) . Η μορφολογία με μικροσκόπιο δείχνει ωοειδή, εκκολαπτόμενα κύτταρα ζυμομύκητα, 2,0-3,5 × 3,5-5,0 μm σε μέγεθος και δεν παράγονται ψευδοϋφές. Η διαφορά πάντως σε σχέση με την *C. guilliermondii* έγκειται στο ότι η δεύτερη έχει πιο επιμήκη κύτταρα και σχηματίζει μικρές ψευδοϋφές, σε αντίθεση με την *C. famata* που δε σχηματίζει.

Σύμφωνα με τους (Sanchez Betancourt *et al.*, 2016) οι λοιμώξεις από αυτόν τον μικροοργανισμό παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς με μειωμένη ανοσοαπόκριση

ενώ έχει αναγνωριστεί ως αιτία της νεογνικής σήψης , της μυκητιακής στοματίτιδας, περιτονίτιδας, για διεισδυτικές λοιμώξεις σε ασθενείς με μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων και για καντιντίαση σε ασθενείς με παιδικό καρκίνο. Αυτό το παθογόνο έχει επίσης περιγραφεί ως άτυπη αιτία κολπίτιδας, ονυχομυκητιάσεων και χολοκυστίτιδας. Λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος που προκαλούνται από *C. famata* φαίνονται να αντιμετωπίζονται με αμφοτερικίνη Β (Beyda *et al.*, 2013).

A.4.6. *Candida krusei*

Η *Candida krusei* έχει κυλινδρικά κύτταρα που μπορεί να φτάσουν 25 μm σε μήκος. Μοιάζουν με το μακρύκοκκο ρύζι, το οποίο έρχεται σε αντίθεση με το σφαιρικό ή το ωοειδές σχήμα άλλων ειδών *Candida*. Όπως η *C. albicans*, η *C. krusei* δείχνει πολυμορφία, παράγοντας υφές όταν αναπτύσσεται σε 37 °C, ενώ σχηματίζει βλαστοκονίδια και ψευδοϋφές όταν επωάζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Οι αποικίες που σχηματίζει όταν καλλιεργείται στους 25-28 °C σε εμπλουτισμένα μέσα καλλιέργειας, όπως εκχύλισμα βύνης ζύμης σε άγαρ με γλυκόζη, εκχύλισμα ζυμομύκητα πεπτόνης με άγαρ γλυκόζης ή Sabouraud agar, είναι στρογγυλές, κρεμώδεις και ομαλές λευκές, περίπου 5-8mm διαμέτρου. Στα τοιχώματα βρέθηκαν οι ίδιοι πολυσακχαρίτες που υπάρχουν και στην *C. albicans*: χιτίνη, β-γλυκάνες και πολυμερή μαννόζης (Gómez-Gaviria and Mora-Montes, 2020).

Η *Candida krusei* έχει αναγνωριστεί ως ένα δυνητικό παθογόνο εξαιτίας της ανθεκτικότητας στη φλουконаζόλη (multidrugresistant - MDR), σε συνδυασμό με αναφορές μειωμένης ευαισθησίας, τόσο στη φλουκυτοσίνη όσο και στην αμφοτερικίνη Β. Επιπλέον, η αμφοτερικίνη Β παρουσιάζει σημαντικά καθυστερημένη θανάτωση της *C. krusei* σε σχέση με την *Candida albicans*. Η *C. krusei* παραμένει συνήθως ευαίσθητος *in vitro* σε βορικοναζόλη, λόγω της πιο αποτελεσματικής δέσμευσής της στο κυτόχρωμα P-450. Περαιτέρω, η βορικοναζόλη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη θεραπεία ορισμένων ασθενών που έχουν μολυνθεί με *C. krusei* (Pfaller *et al.*, 2008).

A.4.7. *Candida lusitaniae*

Σύμφωνα με τη δημοσίευση των Wawrysiuk *et al.* (2018), η *Candida lusitaniae* είναι ένα σπάνιο ευκαιριακό παθογόνο, το οποίο είναι γνωστό για την αντίσταση του στην αμφοτερικίνη Β. Τα στελέχη *C. lusitaniae* εμφανίζουν όχι μόνο αντίσταση στην αμφοτερικίνη Β, αλλά ορισμένα μπορούν να την αναπτύξουν *in vivo*, κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Πιθανό είναι επίσης να γίνει εναλλαγή από ανθεκτικά σε ευαίσθητα στελέχη, αλλά με πολύ χαμηλό ρυθμό.

Τα κύτταρα αυτά σε άγαρ αραβοσίτου-Tween 80 στους 25 ° C για 72 ώρες είναι στρογγυλά προς οβάλ (2-6 × 3-10 μm). Εμφανίζουν ψευδοϋφές που είναι λεπτές, διακλαδισμένες και καμπυλωμένες, με μικρές αλυσίδες από επιμήκη βλαστοκονίδια. Οι αποικίες αντίστοιχα έχουν χρώμα κρεμ, είναι λείες και λαμπερές. Μορφολογικά η *C. lusitaniae*, μοιάζει με *Candida tropicalis* και *Candida parapsilosis* αλλά διαφέρει στην ικανότητά της να ζυμώνει κελλοβιόζη (cellobiose) και συνήθως να αφομοιώσει ραμνόζη (Walsh, Hayden and Larone, 2018).

Στις *in vitro* μελέτες βρέθηκε μια αλλαγή στην κυτταρική μορφολογία της *C. lusitaniae*, όταν μεταβαίνει από την ευαίσθητη μορφή του στην αμφοτερικίνη Β, στην ανθεκτική του μορφή παρουσία του φαρμάκου. Είναι πιθανό οι κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με την αντοχή στο φάρμακο να απεικονίζονται στο CHROMagar Candida, ως διαφορές σε χρώμα αποικίας. Μία σημαντική πρόκληση είναι να προσδιοριστούν τα ανθεκτικά στελέχη στην αμφοτερικίνη Β της *C. lusitaniae*, όταν οι ασθενείς μολύνονται ταυτόχρονα με ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη (Favel *et al.*, 2003)

Η *C. lusitaniae* είναι υπεύθυνη για περίπου το ένα πέμπτο όλων των λοιμώξεων που προκαλούνται από είδη non-*Candida albicans* και για περίπου το 1,7% όλων των περιπτώσεων της καντιντίασης στο ουροποιητικό που προκαλούνται από το σύνολο του φάσματος των ειδών *Candida*. Εμφανίζονται συνήθως σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, ειδικά όταν ένας ασθενής λαμβάνει χημειοθεραπεία. Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν ουδετεροπενία, μακροχρόνια θεραπεία με κορτικοστεροειδή, μεταμόσχευσης μυελού των οστών, αιμοκάθαρση κλπ. Η λοίμωξη από *Candida lusitaniae* ήταν θανάσιμη πριν από την εποχή της φλουконаζόλης. Σήμερα, ο θάνατος των ασθενών με *C. lusitaniae* δεν είναι πολύ

συνηθισμένος και δεν υπερβαίνει το 5% όλων των περιπτώσεων. Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι η λοίμωξη του κυκλοφορικού συστήματος και ακολουθεί η περιτονίτιδα. Το πιο κοινό σύμπτωμα της λοίμωξης του συγκεκριμένου στελέχους είναι ο πυρετός (Hawkins and Baddour, 2003; Wawrysiuk *et al.*, 2018; Apsemidou *et al.*, 2020).



Εικόνα 9. *Candida lusitanae* σε Sabouraud agar και Chromogenic candida agar (Biolife). Επώαση για 48 ώρες στους 37°C και άλλες 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. (<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/chromogenic-candida-agar-candida-lusitanae.html>)

A.4.8. *Candida lipolytica*

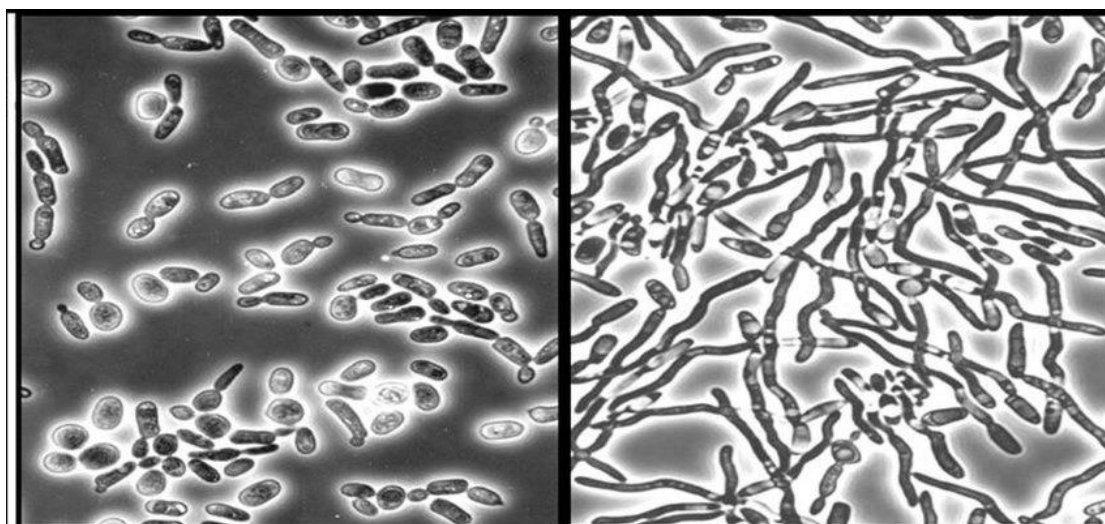
Σύμφωνα με τους Liu *et al.* (2013), η *Candida lipolytica* γνωστή και ως *Yarrowia lipolytica*, είναι ένας αερόβιος μικροοργανισμός, πανταχού παρών στο περιβάλλον, είναι σε θέση να παράγει σημαντικούς μεταβολίτες και έχει έντονη εκκριτική δραστηριότητα. Είναι σε θέση να παράγει λιπάσες και άλλα υδρολυτικά ένζυμα, όπως και μικροβιακό έλαιο, κιτρικό οξύ, ερυθριτόλη και γ-δεκαλακτόνη (Zieniuk and

Fabiszewska, 2019). Χρησιμοποιείται ευρέως στα απορρυπαντικά, στα τρόφιμα και στις φαρμακευτικές βιομηχανίες.

Η *Yarrowia lipolytica* είναι μέλος του φύλου Ascomycota. Το είδος αυτό ονομάστηκε προηγουμένως ως *Candida*, *Endomycopsis* ή *Saccharomycopsis Lipolytica* (Zieniuk and Fabiszewska, 2019). Τα κύτταρα ζυμομυκήτων είναι ωοειδή προς επίπλωση (3-5 3 6-11 mm). Σε άγαρ αραβοσίτου-Tween 80 στους 25°C για 72 ώρες, οι ψευδοϋφές αποτελούνται από κύτταρα που συχνά καμπυλώνουν και είναι ωοειδή ή επιμηκυμένα βλαστοκονίδια, τόσο σε μικρές συστάδες, όσο και σε μικρές αλυσίδες. Αντίστοιχα, οι αποικίες είναι ομαλές, θαμπές, με χρώμα κρεμ προς κιτρινωπό (Walsh, Hayden and Larone, 2018).

Παρόλο που έχει τόσες εφαρμογές, ένας τέτοιος μύκητας μπορεί να εισβάλλει στους ανθρώπους και να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις του αίματος. Έχει χαρακτηριστικά που διευκολύνουν την εισβολή του αλλά και είναι ικανός για την προστασία των δικών του κυττάρων, όπως ο σχηματισμός βιοφίλμ (Zieniuk and Fabiszewska, 2019). Η μόλυνση από *C. lipolytica* εμφανίζεται συχνότερα σε ανοσοκατασταλμένους ή γενικά βαρέως πάσχοντες ασθενείς κατά τη διάρκεια της νοσηλείας. Η ηλικία, το φύλο, το αν ο ασθενής ήταν ουδετεροπενικός, αν υπήρχε ένας μολυσμένος αγγειακός καθετήρας, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Θα μπορούσε εύκολα να εισέλθει στην αιματική κυκλοφορία το παθογόνο, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται συσκευές, όπως οι κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες (Liu *et al.*, 2013).

Οι εχινοκανδίνες είναι ημισυνθετικά κυκλικά λιποπεπτίδια και μη ανταγωνιστικοί αναστολείς της σύνθεσης της 1,3-β-D-γλυκάνης, η οποία αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος. Με βάση τη δραστηριότητα τους σε ένα ευρύ φάσμα έναντι των ειδών *Candida*, οι εχινοκανδίνες χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα για την καντιντίαση, η οποία ήταν ανθεκτική σε άλλες θεραπείες. Φαίνεται ότι αυτές οι ενώσεις έχουν καλή θεραπευτική επίδραση στην καντιντίαση από *C. lipolytica* (Liu *et al.*, 2013; Aguilar-Zapata, Petraitiene and Petraitis, 2015).



Εικόνα 10. Μορφολογία της *Yarrowia lipolytica* ως κύτταρα ζύμης σε μέσο YNB-γλυκόζη (αριστερά), είτε ως μυκήλιο σε μέσο YNB-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (δεξιά). (Rodríguez-Kessler, delaLuz Guerrero-González and Jiménez-Bremont, 2012)

A.4.9. *Trichosporon asahii*

Το γένος *Trichosporon* περιλαμβάνει περίπου 30 είδη, εκ των οποίων τουλάχιστον έξι συνδέονται με τη τριχοσπορίαση: *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. asteroides*, *T. cuthaneum*, *T. inkin* και *T. ovoides*. Περισσότερο από το 90% των δύσκολων περιπτώσεων τριχοσπορίασης προκαλείται από το *T. asahii* και είναι απειλητική για τη ζωή, με ένα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και μια πολύ κακή πρόγνωση. Οι περισσότεροι ασθενείς με αυτή την ασθένεια έχουν μια υποκείμενη αιματολογική κακοήθεια ή νεοπλασματική ασθένεια, και ουδετεροπενία λόγω της χημειοθεραπείας (Ichikawa et al., 2004). Η τριχοσπορίαση έχει αυξημένη συχνότητα τα τελευταία 10-15 χρόνια και μοιάζει με την καντιντίαση τόσο στην κλινική παρουσίαση όσο και στην ιστοπαθολογική εμφάνιση (Ebright, Fairfax and Vazquez, 2001). Επιπλέον, το *T. asahii* είναι σχετικά ανθεκτικό στην αμφοτερικίνη Β.

Σύμφωνα με τους Mendoza and Gonzalez (2014) τα *Trichosporon spp.* ανήκουν στο φύλο Basidiomycota. Είναι ένας μύκητας που μοιάζει με ζυμομύκητας και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ακτινικά συμμετρικών αποικιών. Αυτές οι αποικίες μπορεί να είναι λευκές ή κιτρινωπές, με ομαλή υφή, κρεμώδη, ξηρή ή υγρή. Μικροσκοπικά, σχηματίζει υφές, με πολλά αρθοκονίδια και βλαστοκονίδια, και σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζει τα appressoria. Όσον αφορά στις φυσιολογικές λειτουργίες, αφομοιώνουν αρκετούς υδατάνθρακες και άλλες πηγές άνθρακα, αλλά δε

διαθέτουν δυνατότητες ζύμωσης. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του *Trichosporon spp.* είναι η ικανότητά τους να υδρολύουν ουρία.



Εικόνα 11. Αποικίες *Trichosporon asahii* σε YPGA (yeast peptone glucose agar), επώαση στους 25°C, για 5 ημέρες (http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/t/Trichosporon_asahii_colony.htm)

A.4. BLAST / ISHAM.

Ο μεγάλος αριθμός προγραμμάτων αλληλουχίας γονιδιώματος παγκοσμίως δημιούργησε μια μεγάλη γκάμα πληροφοριών, η οποία συνεχώς αυξάνεται, συμπεριλαμβανομένου των οργανισμών των τριών υπερβασιλείων (Archaea, eubacteria και eukaryota). Ο μεγάλος αριθμός των πλήρων γονιδιωμάτων και η υψηλή πολυπλοκότητα τους στην αλληλουχία, απαιτούν καλύτερα εργαλεία βιοπληροφορικής, για να διευκολύνουν και να βελτιώσουν τη χρήση των πληροφοριών. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τη γονιδιακή αναγνώριση και την εκχώρηση των λειτουργιών τους, με βάση την εύρεση σημαντικών αντιστοιχιών

ομοιότητας στην αλληλουχία, με προηγουμένως γνωστά γονίδια ή πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST και παρόμοια εργαλεία (Cumplings *et al.*, 2002). Το πρόγραμμα BLAST, με λίγα λόγια, είναι εργαλείο που χρησιμοποιείται ευρέως για την αναζήτηση βάσεων δεδομένων πρωτεΐνης και DNA για ομοιότητες στην ακολουθία πρωτεϊνικών ή γονιδιακών αλληλουχιών.

Η βάση δεδομένων ISHAM-ITS είναι αποτέλεσμα μιας διεθνούς συνεργασίας μεταξύ ιατρικών εργαστηρίων. Υπάρχουν ήδη κατατεθειμένες συνολικά 2945 ITS ακολουθίες. Τα είδη αναγνωρίστηκαν με βάση διάφορα κριτήρια, συμπεριλαμβανομένων της μορφολογίας, βιοχημικών, φυσιολογικών εξετάσεων και αλληλούχισης. Μετά τη συλλογή όλων των δεδομένων, η συνολική ταυτότητα των ακολουθιών που λαμβάνονται από περισσότερα από δύο στελέχη ανά είδος, προσδιορίστηκαν, μαζί με τα διαθέσιμα είδη στελεχών. Κάθε είδος ταξινομήθηκε με το ταξινομικό όνομα. Τα τρέχοντα ταξινομικά ονόματα παρέχονται με τη χρήση των δεδομένων διάφορων βάσεων, καθώς και τις τελευταίες δημοσιεύσεις. Όπου υπήρχαν ονόματα πρώην αναμορφικών ειδών ή τελειομορφικών, τα πιο χρησιμοποιούμενα συνώνυμα, παρατίθενται επίσης για να διευκολύνουν την αναγνώριση τους (Irinyl *et al.*, 2015).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΥΛΙΚΑ

- 48 διαφορετικά κλινικά στελέχη ζυμομυκήτων non-albicans σε κρυοφυαλίδια
- Τρυβλία Sabouraud dextrose agar
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Ρύγχηγια αυτόματες πιπέτες
- Μικροβιολογικοί κρίκοι
- Επωαστικοί κλίβανοι
- Μηχάνημα Vortex Genie Turbomix
- Φυγόκεντροι
- Θερμαινόμενη πλάκα
- Φασματοφωτόμετρο
- Κυψελίδες φωτομέτρησης
- Μικροσωληνάρια τύπου Eppendorf
- Κυκλοποιητής PCR
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

B.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1. Ανάπτυξη μυκήτων

Το άγαρ Sabouraud Dextrose (SDA) χρησιμοποιείται για την απομόνωση, την καλλιέργεια και τη συντήρηση μη παθογόνων και παθογόνων ειδών μυκήτων και ζυμών. Το pH του ρυθμίζεται περίπου στο 5,6 προκειμένου να ενισχυθεί η ανάπτυξη μυκήτων και για να ανασταλεί ελαφρώς η ανάπτυξη των βακτηρίων σε κλινικά δείγματα. Περιέχει δεξτρόζη, πεπτόνη και άγαρ. Η πεπτόνη (ενζυμική πέψη της

καζεΐνης και του ζωϊκού ιστού) παρέχει την πηγή αζώτου και βιταμινών που απαιτούνται για την ανάπτυξη του οργανισμού στο SDA. Η δεξτρόζη προστίθεται ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Το άγαρ είναι ο παράγοντας στερεοποίησης. Η χλωραμφενικόλη και / ή η τετρακυκλίνη μπορούν να προστεθούν ως αντιμικροβιακά ευρέος φάσματος για να αναστείλουν την ανάπτυξη των κατά gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων. Μπορεί να προστεθεί και η γενταμυκίνη για την περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των αρνητικών κατά gram βακτηρίων.

Σε πολλά δείγματα, πραγματοποιήθηκε και ανακαλλιέργεια των στελεχών, πριν την επώαση σε SDA, χωρίς όμως να επιτευχθεί ανάπτυξή τους σε όλα, πιθανώς λόγω παλαιότητας κάποιων στελεχών.

Σε τρυβλία με άγαρ Sabouraud Dextrose και Chloramphenicol 0,05% ενοφθαλμίστηκαν 20 μl από το κρυοφιαλίδιο του κάθε στελέχους. Η επώαση έγινε στους 30°C και φάνηκε να αναπτύσσονται μετά από 3-4 ημέρες.

B.2.2. Εκχύλιση με μέθοδο θερμαινόμενης πλάκας

Η εκχύλιση DNA είναι μια μέθοδος καθαρισμού του DNA χρησιμοποιώντας φυσικές και / ή χημικές μεθόδους από ένα δείγμα, με σκοπό τον διαχωρισμό του DNA από τις κυτταρικές μεμβράνες, πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά συστατικά. Η χρήση της τεχνικής απομόνωσης πρέπει να οδηγεί σε αποτελεσματική εκχύλιση με καλή ποσότητα και ποιότητα DNA, η οποία να είναι καθαρή και να στερείται άλλων μορίων, όπως RNA και πρωτεΐνες. Η εκχύλιση DNA περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο τη λύση των κυττάρων και αποδιάταξη του DNA, η οποία ακολουθείται από χημικές ή ενζυματικές μεθόδους για την απομάκρυνση μακρομορίων, όπως τα λιπίδια ή το RNA. Οι τεχνικές εκχύλισης DNA μπορούν να γίνουν με οργανική εκχύλιση (μέθοδος φαινόλης-χλωροφορμίου), με μη οργανική μέθοδο (αλατινοποίηση και προσθήκη πρωτεΐνης K) αλλά και με μέθοδο προσρόφησης (μεμβράνη silica-gel) (Gupta, 2019)

Σε μικροσωληνάρια τύπου eppendorf παρασκευάστηκαν εναιωρήματα με 100 μl buffer, 100 μl βόειο λευκωματίνη και προστέθηκε ικανοποιητική ποσότητα από τον

μύκητα που θέλαμε να ταυτοποιήσουμε. Τα μικροσωληνάρια στη συνέχεια αφέθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα (95°C) για 10 λεπτά . Μετά το πέρας αυτών, έγινε ισχυρή ανάδευση στο Vortex Turbomix για 10 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές/min για 4 λεπτά. Έπειτα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο των δειγμάτων. Τέλος πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση με αραιώση 1/10, δηλαδή 135μl νερό και 15μl δείγματος, στα 260 και στα 280 nm. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να υπολογιστεί εν συνεχεία η καθαρότητα (OD 260/OD 280) και η συγκέντρωση (OD 260*50*αραιώση) του κάθε δείγματος DNA.

B.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction): Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στην παράγραφο A.2.2. , είναι απαραίτητο συχνά η φαινοτυπική ταυτοποίηση να ακολουθείται και από μοριακή (Fujita *et al.*, 2001). Για τα δείγματα της μελέτης, στόχος ήταν η περιοχή που κωδικοποιεί το 5.8S ριβοσωμικό DNA (rDNAs) που είναι αρκετά συντηρημένη ,αλλά και τις ITS1 και ITS2, που ποικίλλουν σε μήκος και ακολουθία, ανάλογα με το είδος.

Η PCR διεξήχθη με όγκο 50 μl, οπότε 10 μl DNA και προστέθηκαν σε 40 μl διάλυμα εργασίας (mastermix), το οποίο περιέχει ένα μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, που αποτελούν το υπόστρωμα για την κατασκευή νέων κλώνων DNA), MgCl₂, Taq πολυμεράση (ένζυμο που απαιτείται για την κατασκευή νέων κλώνων DNA), ενός ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) για το pH και απεσταγμένο νερό μοριακής βιολογίας (ελεύθερο ενζύμων διάσπασης DNA και RNA). Η επιθυμητή συγκέντρωση του DNA για βέλτιστα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη PCR ήταν 30-40 μg/ml. Η ενίσχυση αποτελείται από μια αρχική μετουσίωση στους 94° C για 4 λεπτά, 30 κύκλους στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα, ένωση των αφετηριών στη μήτρα (primer annealing) στους 55° C για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72° C για 1 λεπτό και μια τελική επέκταση στους 72° C για 4 λεπτά. Για έλεγχο της σωστής λειτουργίας της PCR ,τα αποτελέσματα αυτής ηλεκτροφορήθηκαν. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA *Candida albicans* ,ενώ ως αρνητικός μάρτυρας, εκχύλισμα DNA αίματος από ασθενή αρνητικού σε PCR για *Candida*. Η ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος PCR διεξήχθη με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 2% w/v που χρωματίζεται με βρωμιούχο αιθίδιο. Σε κάθε λωρίδα

φορτώθηκε όγκος 5 μl του ενισχυμένου προϊόντος PCR και 1 μl του διαλύματος Gel Loading Solution(Sigma). Όγκος 2 μl ενός δείκτη μοριακού βάρους 50-2000-bp τοποθετήθηκε παράλληλα, για την προσέγγιση του μεγέθους του προϊόντος από την ενίσχυση με PCR.

B.2.4. Αλληλούχιση DNA

Τα δείγματα που θα σταλθούν για ανάλυση πρέπει να έχουν όγκο 15 μl και συγκέντρωση 5 ng/μl. Για αυτό έγινε φωτομέτρηση των προϊόντων PCR, κάνοντας αραιώσεις μέσα στην κυβέτα, 15 μl προϊόντος και 135 μl νερό, με στόχο τελική συγκέντρωση 1/10.

B.2.5. BLAST/ ISHAM.

Οι ακολουθίες που ελήφθησαν από την αλληλούχιση σε αρχεία FASTA , μελετήθηκαν και διορθώθηκαν για λάθη με το πρόγραμμα *Sequence Scanner, Version 1.0* (Applied Biosystems 2005), και τα διορθωμένα προϊόντα εφαρμόστηκαν συγκριτικά και στο πρόγραμμα BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Κατά την εφαρμογή του BLAST στις αλληλουχίες των δειγμάτων του πειράματος επιλέχθηκαν κατά την αντιστοίχιση οι αλληλουχίες της βάσης δεδομένων με τα καλύτερα ποσοστά ομοιότητας 'Max identity' και 'Query cover'. Το κριτήριο 'Max identity' αντιπροσωπεύει το ποσοστό της ομοιότητας (ποσοστό των καταλοίπων που ταιριάζουν μεταξύ τους στην στοίχιση) , ενώ το 'Query cover' αντιπροσωπεύει το ποσοστό του μήκους της αλληλουχίας αναφοράς που χρησιμοποιούμε στο BLAST, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στην στοίχιση. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του query coverage , τόσο καλύτερη είναι η στοίχιση(τόσο μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας αναφοράς μας έχει ταιριάζει στη στοίχιση με τις αλληλουχίες που εμφανίζονται ως αποτέλεσμα του BLAST) (Newellet. al., 2013)

Η ίδια διαδικασία έγινε και για τη βάση δεδομένων ISHAM (International Society for Human & Animal Mycology)

,με τη χρήση των αλληλουχιών του rDNA
<https://its.mycologylab.org/page/Query%20ITSEF>

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον ακόλουθο πίνακα εμφανίζονται τα αποτελέσματα των φαινοτυπικών ταυτοποιήσεων των στελεχών της μελέτης. Να σημειωθεί ότι πέραν των υπολοίπων ειδών ζυμομυκήτων -που ίσως θεωρούνται πιο σπάνια - ,στην περίπτωση των δειγμάτων *C.parapsilosis*, που θεωρούνται πιο συχνά εμφανιζόμενοι μύκητες, από την πληθώρα αυτών επιλέχθηκαν ως άξια μελέτης αυτά με T index (εκτίμηση του πόσο στενά αντιστοιχεί το βιοχημικό προφίλ του οργανισμού στο πιο χαρακτηριστικό σετ αντιδράσεων για κάθε taxon, κυμαίνεται από 0 ως 1) μικρότερο του 0.9:

Πίνακας 1 Φαινοτυπικές ταυτοποιήσεις δειγμάτων

Δείγματα	Φαινοτυπική ταυτοποίηση
M245/18	<i>Candida kefyr</i>
M46/18	<i>Candida kefyr</i>
M133/18	<i>Candida parapsilosis</i>
M220/17	<i>Candida kefyr</i>
M197/16	<i>Candida parapsilosis</i>
T3/17	<i>Candida parapsilosis</i>
M166/14	<i>Candida parapsilosis</i>
M212/20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T15/20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M312/20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M25/21	<i>Candida parapsilosis</i>
M277/13	<i>Candida parapsilosis</i>
M198/13	<i>Candida kefyr</i>
M3/13	<i>Candida parapsilosis</i>
M98/08	<i>Candida parapsilosis</i>
ΔM510	<i>Candida parapsilosis</i>
ΔM105	<i>Candida parapsilosis</i>
T18/18	<i>Candida parapsilosis</i>
T10/19	<i>Candida lipolytica</i>
M291/19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M333/19(A)	<i>Candida kefyr</i>

M333/19(B)	<i>Candida parapsilosis</i>
M362/19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M372/19	<i>Candida parapsilosis</i>
M81/15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M132/14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M192/17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M130/14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ΔM170	<i>Candida guilliermondii</i>
M41/19	<i>Candida guilliermondii</i>
M219/18	<i>Candida guilliermondii</i>
ΔM467	<i>Candida guilliermondii</i>
ΔM95	<i>Candida parapsilosis</i>
M155/19	<i>Candida kruzei</i>
M265/18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ΔM442	<i>Candida famata</i>
M39/14	<i>Candida inconspicua</i>
M154/15	<i>Candida lusitaniae</i>
ΔM484	<i>Candida lusitaniae</i>
ΔM430	<i>Candida lusitaniae</i>
M276/17	<i>Trichosporon asahii</i>
M300/17	<i>Trichosporon asahii</i>
M142/13	<i>Trichosporon asahii</i>
M113/11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M224/13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M226/14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M5/21	<i>Candida pulcherima</i>
M56/18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Μετά την εκχύλιση του DNA από τα δείγματα με την μέθοδο της θερμαινόμενης πλάκας που περιγράφηκε στην παράγραφο Β.2.2. , έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 και στα 280 nm. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η καθαρότητα των δειγμάτων με τον λόγο των δυο απορροφήσεων. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA σύμφωνα με τον τύπο: ***συγκέντρωση(μg/ml)=A260(απορρόφηση) x50***

$\mu\text{g/ml} \times 10$ (αραίωση). Η επιθυμητή καθαρότητα όμως είναι κοντά στην τιμή 2. Εάν η αναλογία DNAOD260 / OD280 είναι μεταξύ 1,8 και 2,0, η καθαρότητα του DNA (χωρίς ρύπους πρωτεΐνης) είναι ~ 90% ή και υψηλότερη.

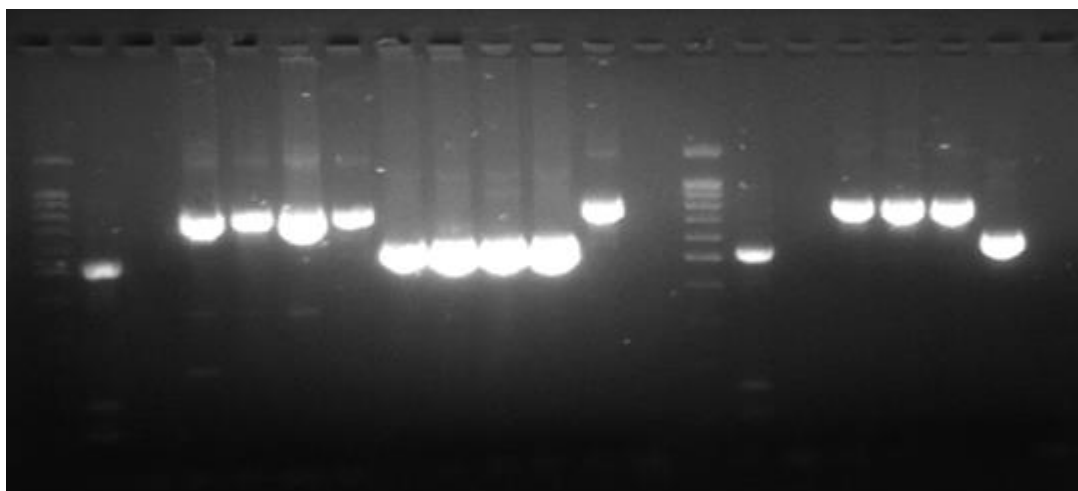
Πίνακας 2 Τιμές οπτικών απορροφήσεων στα 260 nm και 280 nm, καθαρότητα των δειγμάτων και συγκεντρώσεις τους

Δείγμα	OD260(nm)	OD280(nm)	Καθαρότητα	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$)	Αραίωση
M198/13	0,759	0,564	1,35	379,5	1/10
M333/19 A	0,643	0,428	1,5	321,5	1/10
M98/08	1,039	0,698	1,49	519,5	1/15
M46/18	1,127	0,803	1,4	563,5	1/15
M224/13	0,439	0,323	1,36	219,5	1/5
T10/19	0,652	0,435	1,5	326	1/10
M245/18	1,727	1,259	1,37	863,5	1/20
T18/18	0,386	0,258	1,5	193	1/5
M220/17	0,455	0,308	1,48	227	1/5
M197/16	0,295	0,208	1,42	147	1/5
ΔM510	0,467	0,306	1,53	233	1/5
M333/19 B	0,375	0,259	1,45	187	1/5
M133/18	0,295	0,212	1,39	147	1/5
M372/19	0,54	0,34	1,59	270	1/5
M277/13	0,343	0,277	1,51	171	1/5
ΔM105	0,365	0,235	1,66	182	1/5
M166/14	0,406	0,258	1,57	203	1/5
ΔM95	0,57	0,456	1,25	285	1/5
T3/17	0,551	0,496	1,11	275	1/5
M3/13	0,292	0,21	1,39	146	1/5
M291/19	0,445	0,325	1,37	222	1/5
M362/19	0,573	0,502	1,14	286	1/5
M81/15	0,44	0,313	1,41	220	1/5
M132/14	0,362	0,274	1,32	181	1/5
M192/17	0,34	0,26	1,32	170	1/5

M130/14	0,77	0,567	1,36	385	1/10
ΔM170	0,406	0,315	1,29	203	1/5
M265/18	0,780	0,597	1,31	390	1/10
M219/18	1,076	0,765	1,41	538	1/10
ΔM467	0,474	0,384	1,23	237	1/5
M155/19	0,98	0,728	1,35	490	1/15
ΔM442	0,496	0,373	1,33	248	1/10
M39/14	0,697	0,47	1,48	348,5	1/10
M154/15	0,746	0,517	1,44	273	1/10
M56/18	0,678	0,535	1,27	339	1/10
ΔM484	1,254	0,972	1,29	627	-
ΔM430	0,492	0,404	1,22	246	1/10
M276/17	0,512	0,457	1,12	256	1/10
M142/13	0,548	0,405	1,35	274	1/10
M300/17	1,132	0,766	1,48	566	1/20
M226/14	0,554	0,481	1,15	277	1/5
M113/11	1,115	0,683	1,63	557,5	1/10
M212/20	1,243	0,741	1,677	621,5	1/30
T15/20	1,722	1,191	1,45	861	1/40
M312/20	1,432	0,517	1,75	716	-
M5/21	1,054	0,064	1,58	527	1/20
M25/21	1,529	0,901	1,69	761	1/30
M41/19	1,456	1,249	1,16	728	1/20

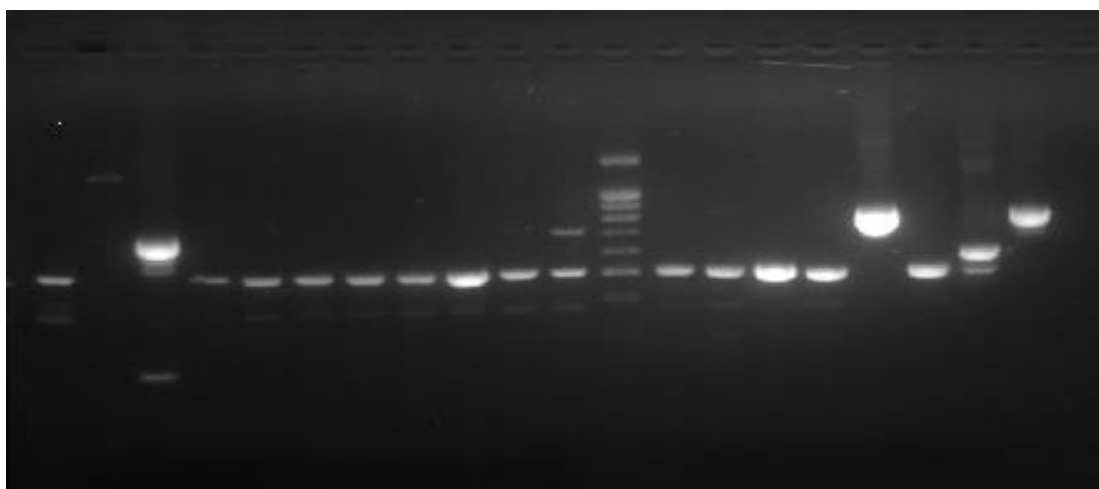
Από τον πίνακα και τις τιμές της καθαρότητας των δειγμάτων, φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα είναι υψηλής συγκέντρωσης και μέτριας καθαρότητας. Η μέτρια αυτή καθαρότητα δε φάνηκε να επηρεάζει στην πορεία ούτε την ενίσχυση με την PCR, ούτε όμως και το ηλεκτροφορούμενο προϊόν, όπου πάντα είχε πολύ καλή απεικόνιση, ενώ και οι αλληλουχίσσεις συνήθως περιείχαν ελάχιστα λάθη.

Μερικά ενδεικτικά αποτελέσματα από τις ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων παραθέτονται παρακάτω. Σε όλα τα παρακάτω δείγματα η PCR διεξήχθη με χρήση εκκινητών για την περιοχή ITS1:



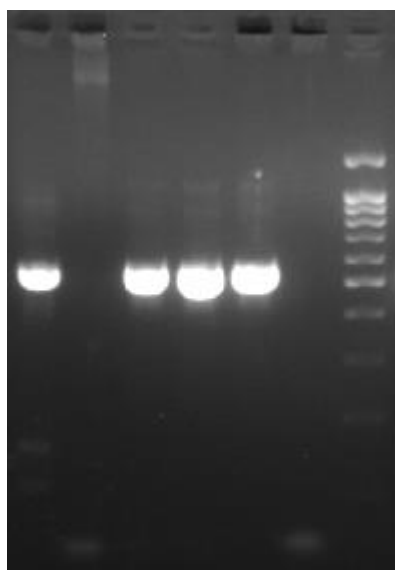
Εικόνα 12. 1.Ladder, 2.(+), 3.(-), 4.M81/15(*S. cerevisiae*), 5.M132/14(*S. cerevisiae*), 6.M192/17(*S. cerevisiae*), 7.M131/14(*S. cerevisiae*), 8.ΔM170(*C. guilliermondii*), 9.M41/19(*C. guilliermondii*), 10.M219/18(*C. guilliermondii*), 11.ΔM467(*C. guilliermondii*), 12.M113/11(*S. cerevisiae*), 13.H2O

14.Ladder, 15.(+), 16.(-), 17.M226/14(*S. cerevisiae*), 18.M224/13(*S. cerevisiae*), 19.M130/14(*S. cerevisiae*), 21.H2O



Εικόνα 13. 1 (+), 2 (-), 3.M333/19 A (*C. kefyr*), 4.T18/18 (*C. parapsilosis*), 5.M220/17 (*C. parapsilosis*), 6.ΔM510 (*C. parapsilosis*), 7.M133/18 (*C. parapsilosis*), 8.M277/13 (*C. parapsilosis*), 9.M166/14 (*C. parapsilosis*), 10.M197/16 (*C. parapsilosis*), 11.M333/19 B (*C. parapsilosis*)

12.LADDER, 13.M372/19 (*C. parapsilosis*), 14.ΔM105 (*C. parapsilosis*), 15.T3/17 (*C. parapsilosis*), 16.ΔM95 (*C. parapsilosis*), 17.M291/19 (*S. cerevisiae*). 18.M3/13 (*C. parapsilosis*), 19.M319/19 (*C. parapsilosis*), 20.M362/19 (*S. cerevisiae*), 21.H2O



Εικόνα 14. 1.(+), 2.(-), 3.M276/17 (*T. asahii*), 4.M300/17 (*T. asahii*), 5.M142/13 (*T. asahii*), 6.H₂O, 7.Ladder

Ακολουθεί ο πίνακας με τη μοριακή ταυτοποίηση αλλά και το ποσοστό συσχέτισης με τις βάσεις δεδομένων BLAST και ISHAM. Όλες οι αλληλουχίες των στελεχών κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank έλαβαν αντίστοιχο κωδικό.

Πίνακας 3. Είδη των δειγμάτων που ταυτοποιήθηκαν μετά την μοριακή ταυτοποίηση σε σύγκριση με τις βάσεις δεδομένων BLAST και ISHAM

Αριθμός δείγματος	Είδος που ταυτοποιήθηκε	BLAST ID	BLAST Query	ISHAM ID	ISHAM Query
M46/18	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99,85%	100%	100%	98,10%
M277/13	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	98,94%	100%
M362/19	<i>S.cerevisiae</i>	100%	99%	100%	98,84%
M372/19	<i>C.parapsilosis</i>	99,78%	100%	100%	98,03%
M133/18	<i>C.parapsilosis</i>	99,76%	100%	100%	95,90%
M220/17	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	100%	94,81%
M197/16	<i>C.parapsilosis</i>	100%	99%	100%	97,68%

M166/14	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	100%	97,27%
ΔM510	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	100%	94,66%
T3/17	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	100%	94,88%
T18/18	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	100%	94,86%
M81/15	<i>S.cerevisiae</i>	99,87%	100%	99,48%	97,83%
M132/14	<i>S.cerevisiae</i> 'boulardii'	100%	99%	100%	97,21%
M192/17	<i>S.cerevisiae</i>	100%	100%	99,70%	95,75%
ΔM170	<i>Meyerozyma/pic</i> <i>hia/candida</i> <i>guilliermondii</i>	99,47%	100%	100%	93,37%
M41/19	<i>Meyerozyma</i> <i>caribbica/carpo</i> <i>philla</i> <i>guilliermondii</i>	99,47%	100%	100%	93,53%
M219/18	<i>Meyerozyma/pic</i> <i>hia/candida</i> <i>guilliermondii</i>	99,64%	100%	100%	94,19%
M130/14	<i>S.cerevisiae</i> 'boulardii'	100%	99%	100%	97,59%
ΔM467	<i>Meyerozyma/pic</i> <i>hia/candida</i> <i>guilliermondii</i>	100%	99%	100%	95,03%
M212/20	<i>S.cerevisiae</i>	99,74%	100%	100%	93,85%
T15/20	<i>S.cerevisiae</i>	100%	99%	100%	98,59%
M312/20	<i>S.cerevisiae</i>	100%	100%	100%	97,59%
M25/21	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	100%	95,01%
M113/11	<i>S.cerevisiae</i> 'boulardii'	99,82%	100%	100%	97,72%
M224/13	<i>S.cerevisiae</i>	99,86%	100%	100%	98,60%
M226/14	<i>S.cerevisiae</i>	100%	100%	100%	98,30%
M5/21	<i>Clavispora</i>	100%	100%	100%	95,63%

	<i>lusitaniae</i>				
M245/18	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	100%	100%	100%	95,95%
M198/13	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99,85%	100%	100%	96,83%
M3/13	<i>C.parapsilosis</i>	99,79%	100%	98,94%	97,93%
M98/08	<i>C.orthopsilosis</i>	100%	100%	100%	97,25%
ΔM105	<i>C.orthopsilosis</i>	99,73%	100%	99,73%	97,33%
ΔM95	<i>C.orthopsilosis</i>	99,79%	100%	100%	93,47%
T10/19	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99,67%	100%	100%	92,26%
M291/19	<i>S.cerevisiae</i>	100%	100%	99,44%	94,42%
M333/19(A)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99,85%	100%	100%	97,40%
M333/19(B)	<i>C.parapsilosis</i>	100%	100%	100%	97,80%
M155/19	<i>Pichia kudriavzevi</i>	99,78%	100%	100%	95,64%
M265/18	<i>S.cerevisiae</i>	100%	99%	99,67%	97,12%
ΔM442	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99,66%	100%	99,82%	93,18%
M39/14	<i>Pichia norvegensis</i>	100%	100%	100%	96,06%
M154/15	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100%	100%	100%	95,76%
M56/18	<i>S.cerevisiae</i>	100%	100%	100%	89,21%
ΔM484	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99,27%	100%	99,61%	90,88%
ΔM430	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100%	100%	100%	95,15%
M276/17	<i>Trichosporon asahii</i>	100%	100%	100%	98,13%

M300/17	<i>Trichosporon asahii</i>	100%	99%	100%	97,53%
M142/13	<i>Trichosporon asahii</i>	99,79%	100%	100%	97,53%

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ευκαιριακοί παθογόνοι μύκητες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα επιφανειακών και συστηματικών λοιμώξεων, οι οποίες συχνά είναι θανατηφόρες. Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των παθογόνων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Η ανοσοκαταστολή, η εκτεταμένη χρήση καθετήρων, αντιβιοτικών ευρέων φάσματος και οι χειρουργικές επεμβάσεις ευνοούν την εξάπλωση των ευκαιριακών μικροοργανισμών (Arastehfar *et al.*, 2019). Αν και στη πλειοψηφία των περιπτώσεων, η λοίμωξη αποδίδεται στο *Candida albicans*, υπάρχουν αυξανόμενα ποσοστά μόλυνσης από είδη non-*albicans*. Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται από τα ιατρικά εργαστήρια για την ταυτοποίηση των ιατρικά σημαντικών ειδών, έχουν ενισχυθεί προοδευτικά από μεθόδους με βάση την PCR, με τις οποίες μπορεί να γίνει ακριβής αναγνώριση και των πιο σπάνιων ειδών της *Candida* (Merseguet *et al.*, 2015).

Ένα πλεονέκτημα της χρήσης της γονιδιακής περιοχής ITS στην PCR, είναι ότι τα περισσότερα μυκητιακά είδη έχουν ταυτοποιηθεί με βάση αυτή τη γονιδιωματική περιοχή. Η περιοχή ITS περιλαμβάνει δύο τμήματα (ITS1 και ITS2) που είναι δίπλα στην συντηρημένη περιοχή 5.8S, που φαίνεται ότι είναι ίδια στα διάφορα είδη μυκήτων (Badotti *et al.*, 2017). Μετά την ταυτοποίηση, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων GenBank (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>), η οποία είναι το πιο ολοκληρωμένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο αποθετήριο αλληλουχιών μικροοργανισμών.

Για τις μοριακές ταυτοποιήσεις, σχεδόν σε όλα τα δείγματα η φαινοτυπική ταυτοποίηση ταυτίζεται με τα αποτελέσματα των αλληλουχιών που ελέγχθηκαν στο BLAST και το ISHAM. Παρατηρούμε, όσον αφορά στην πλειοψηφία των δειγμάτων, ότι μέσω της ISHAM παίρνουμε συνολικά υψηλότερο ποσοστό ταυτοποίησης (ID%) συγκριτικά με την BLAST, το αντίστροφο όμως συμβαίνει όσον αφορά το ποσοστό 'query coverage'. Η βάση ISHAM αφορά αποκλειστικά μύκητες, συνεπώς είναι επόμενο να υπάρχει μεγάλο ποσοστό αντιστοίχισης της αλληλουχίας μελέτης με τις αντίστοιχες της βάσης. Από την άλλη, η BLAST περιλαμβάνει πολύ μεγαλύτερο πλήθος αλληλουχιών από όλον τον κόσμο, συνεπώς είναι πιο εύκολο να βρεθούν αλληλουχίες με αντιστοίχιση στο μεγαλύτερο δυνατό εύρος μεταξύ αλληλουχιών (query coverage). Το M312/20 εμφάνισε ίδιο μέγιστο hit με το M130/14. Το M113/11 εμφάνισε με το T15/20, το M226/14 και το M130/14. Το M224/13 εμφάνισε αντίστοιχα με τα T15/20 και M130/14, ενώ το M226/14 με το T15/20. Όλα αυτά τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν, τόσο φαινοτυπικά, όσο και μοριακά ως *S.cerevisiae* και *S.cerevisiae boulardii*. Έχει ειπωθεί ότι οι *S. cerevisiae* και *S. boulardii* είναι διαφορετικοί μικροοργανισμοί με ταξινομικές, μεταβολικές και μοριακές διαφορές. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Riquelme et al. (2003) πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει, αντιθέτως, μπορεί να δηλωθεί ότι τα στελέχη του *S. boulardii* είναι στελέχη του είδους *S. cerevisiae*, δεν είναι εκπρόσωποι ενός ξεχωριστού είδους. Όσον αφορά στα συγκεκριμένα δείγματα, που τελικά ανήκουν όλα στο ίδιο είδος, ίσως αυτές οι λοιμώξεις να οφείλονται στα ίδια στελέχη, καθώς πιθανώς συνδέονται με την ενδονοσοκομειακή χρήση προβιοτικών που περιέχουν το συγκεκριμένο είδος. Τα συγκεκριμένα προβιοτικά χορηγούνται για προφύλαξη στη διάρκεια μακροχρόνιας θεραπείας με αντιβιοτικά.

Στα υπόλοιπα δείγματα, βλέπουμε μερικές διαφοροποιήσεις στην ονοματολογία των μυκήτων. Αυτό συμβαίνει επειδή στη βιβλιογραφία, πολλές φορές διάφορα είδη έχουν πληθώρα ονομάτων, ενώ υπάρχουν και οι περιπτώσεις των αναμορφικών και των τελειομορφικών στελεχών. Ο μύκητας *Kluyveromyces marxianus* είναι το τελειομορφικό είδος, δηλαδή η σεξουαλική μορφή της *C. kefir* (Karim, Gerliani and Aïder, 2020).

Όσον αφορά την *Candida guilliermondii*, στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως *Meyerozyma guilliermondii* (αναμορφικό είδος της *Candida/Pichia guilliermondii*) και *Meyerozyma caribbica* (αναμορφικό είδος του *Candida fermentati*), που είναι στενά συνδεδεμένα είδη του γενετικά ετερογενούς συμπλέγματος *guilliermondii*.

Αντίστοιχα, η *Clavispora lusitaniae* είναι συνώνυμη της *Candida lusitaniae*. (Krcmery *et al.*, 1999) και ο μύκητας *Debaryomyces hansenii* είναι γνωστός και ως *Candida famata* (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008). Τέλος, όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο Α.4.8, η *Yarrowia Lipolytica* είναι συνώνυμη της *Candida lipolytica* (Liu *et al.*, 2013).

Τα είδη *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis* και *Candida glycerinogenes*, παλιότερα θεωρούνταν διαφορετικοί μικροοργανισμοί. Ωστόσο, οι Douglass *et al.*, (2018) απέδειξαν ότι τελικά περιγράφουν όλα το είδος *Candida krusei*.

Όσον αφορά τα δείγματα M98/08, ΔM105 και ΔM95, τα οποία είχαν φαινοτυπικά ταυτοποιηθεί ως *C.parapsilosis*, φαίνεται τελικά από την μοριακή ταυτοποίηση ότι και τα τρία αναφέρονται στο είδος *C.orthopsilosis*, που διαχωρίζεται από την *C.parapsilosis*, αλλά είναι πολύ συγγενικά μεταξύ τους είδη.

Όσον αφορά την *C. incospicua* (δείγμα M39/14) που μοριακά ταυτοποιήθηκε ως *Pichia norvegensis*, πρόκειται για διαφορετικά είδη που όμως δε διαχωρίζονται μεταξύ τους με τις τυπικές βιοχημικές μεθόδους και φαίνεται ότι ανήκουν και τα δύο στον φυλογενετικό κλάδο *Pichia cactophila* (τελειόμορφο της *C.incospicua*) (Guitard J. *et. Al*, 2015).

Βάσει όλων των παραπάνω ,πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος στο TaxonomyBrowser της βάσης δεδομένων NCBI, που επαληθεύει την ταύτιση των ονομάτων των διαφόρων ειδών που μελετήθηκαν (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).

Συμπερασματικά , παρατηρείται ότι οι φαινοτυπικές ταυτοποιήσεις των δειγμάτων της μελέτης στο σύνολό τους επιβεβαιώνονται και μοριακά. Η μοριακή μέθοδος (PCR και αλληλούχιση) που χρησιμοποιήθηκε παρείχε μάλιστα την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ τελειομορφικής και αναμορφικής μορφής του μύκητα. Πολλοί πλειομορφικοί μύκητες όμως , φέρουν ακόμα δύο ονομασίες, κάτι που έχει επαληθευτεί και από αλληλούχιση ITS αλληλουχιών και σύγκρισή τους με αντίστοιχες στη βάση δεδομένων GenBank. Αυτές οι δύο ονομασίες αφορούν τον ίδιο μύκητα , με κάποιες αλληλουχίες να έχουν κατατεθεί με την τελειομορφική και άλλες με την αναμορφική του ονομασία. Το φαινόμενο αυτό της διπλής ονοματολογίας φαίνεται να συνεχίζει να επικρατεί για πάνω από 20 χρόνια , καθώς λίγοι είναι οι μυκητολόγοι που ενδιαφέρονται και για τη μοριακή φυλογενετική και την ονοματολογία ταυτόχρονα (Taylor John W.,2011). Σε πολυάριθμες μελέτες , μεταξύ

των οποίων και αυτή των Houdbraken et. al (2010), άρχισε να επικρατεί η ιδέα της χρήσης ενός ονόματος για έναν μύκητα (Reynolds & Taylor 1992) , και ειδικότερα της αναμορφικής ονομασίας, κάτι που βέβαια τότε ερχόταν ενάντια στον κώδικα ονοματολογίας της ICBN (International Code of Botanical Nomenclature). Επιπλέον , φυλογενετική ανάλυση των Berbee και Taylor (1992) σε rDNA ενισχυμένο μέσω PCR , καθώς και νωρίτερα μελέτες στο *Fusarium* (Guadet et. Al, 1989), αποδεικνύουν ότι η ξεχωριστή ταξινόμηση για τους ατελείς μύκητες ή Δευτερομύκητες (Deuteromycota,, ασεξουαλική μορφή μυκήτων) είναι περιττή. Το 2011 μάλιστα, στο συνέδριο της Μελβούρνης, εγκρίθηκε η πρόταση της απόρριψης του συστήματος της διπλής ονοματολογίας, απλά με κάποια προστατευτικά μέτρα (Norvell 2011, McNeill et al. 2011). Πλέον , κρίνεται επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός κώδικα ονοματολογίας για τους μύκητες.

Όσον αφορά στην περίπτωση της *C.auris* , δε φάνηκε να εμφανίζεται ως κρυπτικό είδος μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη , κάτι που θα μπορούσε να είναι μια πιθανή ένδειξη πως ο συγκεκριμένος μύκητας δεν έχει εξαπλωθεί ακόμα στη χώρα μας (καθώς το εργαστήριο διαχειρίζεται κλινικά δείγματα από πληθώρα νοσοκομείων της Ελλάδας).

Συνοψίζοντας , μοριακές μέθοδοι όπως η PCR και αλληλούχιση μπορούν να αποδειχτούν πολύ χρήσιμες για την πλήρη και αναλυτική ταυτοποίηση της ταξινόμησης μυκήτων και ίσως σε κάποιες περιπτώσεις να βοηθήσουν στην πιο στοχευμένη αγωγή αντιμετώπισης του μύκητα. Παρόλα αυτά , είναι διαδικασίες χρονοβόρες συγκριτικά με την επιλογή της φαινοτυπικής ταυτοποίησης , η οποία είναι πιο γρήγορη , φθηνή και ταυτόχρονα παρέχει επίσης αξιόπιστα αποτελέσματα , χαρακτηριστικά τα οποία είναι υψηλού ενδιαφέροντος στις κλινικές πρακτικές, όπου η γρήγορη διάγνωση και άμεση αντιμετώπιση είναι υψίστης σημασίας για την θεραπεία της πληθώρας των ασθενών που πάσχουν από λοιμώξεις στα νοσοκομεία.

Βιβλιογραφία

1. Aguilar-Zapata, D., Petraitiene, R. and Petraitis, V. (2015) ‘Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium’, *Clinical Infectious Diseases*, 61(May), pp. S604–S611. doi: 10.1093/cid/civ814.

2. Apsemidou, A. *et al.* (2020) ‘Candida lusitaniae Breakthrough Fungemia in an Immuno-Comp esed Adolescent: Case Report and Review of the Literature’, *Journal of Fungi*, 6(4), p. 380. doi: 10.3390/jof6040380.
3. Arana, D. M. *et al.* (2009) ‘The role of the cell wall in fungal pathogenesis’, *Microbial Biotechnology*, 2(3), pp. 308–320. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00070.x.
4. Arastehfar, A. *et al.* (2019) ‘Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: From PCR to NGS’, *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), pp. 517–547. doi: 10.1093/femsre/fuz015.
5. Badotti, F. *et al.* (2017) ‘Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi)’, *BMC Microbiology*, 17(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12866-017-0958-x.
6. Berbee ML, Taylor JW (1992) 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Experimental Mycology* 16: 87–91.
7. Bernstein, H. B. C. (2018) ‘Sexual Processes in Microbial Eukaryotes’, *Intech*, 32, pp. 137–144. Available at: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-telecommunications-technologies/gps-total-electron-content-tec-prediction-at-ionosphere-layer-over-the-equatorial-region%0AInTec>.
8. Beyda, N. D. *et al.* (2013) ‘Treatment of Candida famata bloodstream infections: Case series and review of the literature’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), pp. 438–443. doi: 10.1093/jac/dks388.
9. Blaalid, R. *et al.* (2013) ‘ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi’, *Molecular Ecology Resources*, 13(2), pp. 218–224. doi: 10.1111/1755-0998.12065.
10. Bowman, S. M. and Free, S. J. (2006) ‘The structure and synthesis of the fungal cell wall’, *BioEssays*, 28(8), pp. 799–808. doi: 10.1002/bies.20441.
11. Britz E, Govender NP. 2016. Global emergence of a multi-drug resistant fungal pathogen, *Candida auris*. *S Afr J Infect Dis* **31**(3):3–4. doi:10.1080/23120053.2016.1221613
12. Bui, V. C., Kim, Y. U. and Choi, S. S. (2008) ‘Physical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*’, *Surface and Interface Analysis*, 40(10), pp. 1323–1327. doi: 10.1002/sia.2899.
13. Casalone, E. *et al.* (2005) ‘Characterization of *Saccharomyces cerevisiae*

- natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology’, *Research in Microbiology*, 156(2), pp. 191–200. doi: 10.1016/j.resmic.2004.09.008.
14. Centers for Disease Control and Prevention. 2016. Clinical alert to U.S. healthcare facilities—June 2016. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/candida-auris-alert.html> Accessed 24 February 2017. [Google Scholar]
 15. Chow, J. K. *et al.* (2008) ‘Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit’, *Clinical Infectious Diseases*, 46(8), pp. 1206–1213. doi: 10.1086/529435.
 16. Cummings, L. *et al.* (2002) ‘Genomic BLAST: Custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes’, *FEMS Microbiology Letters*, 216(2), pp. 133–138. doi: 10.1016/S0378-1097(02)00955-2.
 17. Desnos-Ollivier, M. *et al.* (2008) ‘*Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*)’, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), pp. 3237–3242. doi: 10.1128/JCM.01451-08.
 18. Direkze, S. *et al.* (2012) ‘*Candida kefyr* fungal enteritis following autologous BMT’, *Bone Marrow Transplantation*, 47(3), pp. 465–466. doi: 10.1038/bmt.2011.112.
 19. Douglass, A. P. *et al.* (2018) ‘Population genomics shows no distinction between pathogenic *C. Douglass*, A. P., Offei, B., Braun-Galleani, S., Coughlan, A. Y., Martos, A. A. R., Ortiz-Merino, R. A., ... Wolfe, K. H. (2018). Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida*’, *PLoS Pathogens*, 14(7), pp. 1–27.
 20. Dufresne, S. F. *et al.* (2014) ‘Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies’, *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), pp. 1830–1837. doi: 10.1128/JCM.00131-14.
 21. Dyomin, A. *et al.* (2017) ‘Evolution of ribosomal internal transcribed spacers in Deuterostomia’, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 116, pp. 87–96. doi: 10.1016/j.ympev.2017.08.015.
 22. Ebright, J. R., Fairfax, M. R. and Vazquez, J. A. (2001) ‘*Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia.’, *Clinical infectious diseases : an official publication of the*

- Infectious Diseases Society of America*, 33(5), pp. 28–30. doi: 10.1086/322640.
23. Favel, A. *et al.* (2003) ‘Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: Case report and review of the literature’, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1), pp. 331–339. doi: 10.1016/S0732-8893(03)00094-4.
 24. Free, S. J. (2013) *Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis*. 1st edn, *Advances in Genetics*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6.
 25. Fujita, S. I. *et al.* (2001) ‘Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains’, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), pp. 3617–3622. doi: 10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001.
 26. Ge, G. *et al.* (2019) ‘Different toenail onychomycosis due to *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida parapsilosis* in an immunocompetent young adult’, *Medical Mycology Case Reports*, 24(May), pp. 69–71. doi: 10.1016/j.mmcr.2019.04.012.
 27. Girmenia, C. *et al.* (2006) ‘*Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies’, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), pp. 2458–2464. doi: 10.1128/JCM.00356-06.
 28. Gómez-Gaviria, M. and Mora-Montes, H. M. (2020) ‘Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen’, *Infection and Drug Resistance*, 13, pp. 1673–1689. doi: 10.2147/IDR.S247944.
 29. Grubb, S. E. W. *et al.* (2008) ‘*Candida albicans*-endothelial cell interactions: A key step in the pathogenesis of systemic candidiasis’, *Infection and Immunity*, 76(10), pp. 4370–4377. doi: 10.1128/IAI.00332-08.
 30. Guadet J, Julien J, Lafay JF, Brygoo Y (1989) Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit Rrna sequence comparison. *Molecular Biology and Evolution* 6: 227–242.
 31. Guitard J., Atanasova R., Brossas J. Y., Meyer I., Gits M., Marinach C., laissamy S. Vel, Angoulvant A., Mazier D., and Hennequina C. (2015) ‘*Candida inconspicua* and *Candida norvegensis*: New Insights into Identification in Relation to Sexual Reproduction and Genome Organization’ ,

- Journal of Clinical Microbiology, 53(5): 1655–1661. doi: 10.1128/JCM.02913-14
32. Gupta, N. (2019) 'DNA extraction and polymerase chain reaction', *Journal of Cytology*, 36(2), pp. 116–117. doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18.
 33. Halawi, M. H. *et al.* (2020) 'First Case of Identification of *Candida kefyr* and *Pichia kluyveri* in Lebanese Water', *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(3). doi: 10.1007/s11270-020-4460-y.
 34. Hallen-Adams, H. E. and Suhr, M. J. (2017) 'Fungi in the healthy human gastrointestinal tract', *Virulence*, 8(3), pp. 352–358. doi: 10.1080/21505594.2016.1247140.
 35. Hawkins, J. L. and Baddour, L. M. (2003) 'Candida lusitanae infections in the era of fluconazole availability.', *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(2). doi: 10.1086/344651.
 36. Hof, H. (2019) 'Rhodotorula spp. in the gut - foe or friend?', *GMS infectious diseases*, 7, p. Doc02. doi: 10.3205/id000042.
 37. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2010) Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity* **44**: 117-133.
 38. Ichikawa, T. *et al.* (2004) 'Phenotypic Switching and β -N-Acetylhexosaminidase Activity of the Pathogenic Yeast *Trichosporon asahii*', *Microbiology and Immunology*, 48(4), pp. 237–242. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03519.x.
 39. 'Id 32 C' (2001) *English*, pp. 1–3. Irinyi, L. *et al.* (2015) 'International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database - The quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi', *Medical Mycology*, 53(4), pp. 313–337. doi: 10.1093/mmy/myv008.
 40. Johnson, E. M. (2009) 'Rare and emerging *Candida* species', *Current Fungal Infection Reports*, 3(3), pp. 152–159. doi: 10.1007/s12281-009-0020-z.
 41. Karim, A., Gerliani, N. and Aider, M. (2020) '*Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology', *International Journal of Food Microbiology*, 333(August), p. 108818. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818.
 42. Kordalewska M., Zhao Y., Lockhart S.R, Chowdhary A., Berrio A. and D Perlin D.S(2017) 'Rapid and Accurate Molecular Identification of the

- Emerging Multidrug-Resistant Pathogen *Candida auris*', *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8): 2445–2452. doi: 10.1128/JCM.00630-17
43. Krcmery, V. *et al.* (1999) 'Invasive infections due to *Clavispora lusitanae*', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 23(1), pp. 75–78. doi: 10.1016/S0928-8244(98)00110-2.
 44. Krcmery, V. and Barnes, A. J. (2002) 'Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance', *Journal of Hospital Infection*, 50(4), pp. 243–260. doi: 10.1053/jhin.2001.1151.
 45. Krijgheld, P. *et al.* (2013) 'Development in *aspergillus*', *Studies in Mycology*, 74, pp. 1–29. doi: 10.3114/sim0006.
 46. Lesage, G. and Bussey, H. (2006) 'Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), pp. 317–343. doi: 10.1128/mmbr.00038-05.
 47. Liu, W. C. *et al.* (2013) 'Candida lipolytica candidemia as a rare infectious complication of acute pancreatitis: A case report and literature review', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(5), pp. 393–396. doi: 10.1016/j.jmii.2013.04.007.
 48. Marcos-Zambrano, L. J. *et al.* (2017) 'Candida guilliermondii complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), p. 28007. doi: 10.1128/AAC.00099-17.
 49. Matlock, B. (2015) 'Assessment of Nucleic Acid Purity', *Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*, pp. 1–2.
 50. Mbareche, H. *et al.* (2020) 'Comparison of the performance of ITS1 and ITS2 as barcodes in amplicon-based sequencing of bioaerosols', *PeerJ*, 2020(2), pp. 1–36. doi: 10.7717/peerj.8523.
 51. McNeill J, Turland NJ (2011) Synopsis of proposals on botanical nomenclature Melbourne 2011: a review of the proposals concerning the International Code of Botanical Nomenclature submitted to the XVIII International Botanical Congress. *Taxon* 60: 243–286
 52. McNeill J, Turland NJ, Monro A, Lepschi BJ (2011) XVIII International Botanical Congress: preliminary mail vote and report of Congress action on nomenclature proposals. *Taxon* 60: 1507–1520.
 53. Merseguet, K. B. *et al.* (2015) 'Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection', *BMC Infectious*

- Diseases*, 15(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12879-015-0793-3.
54. Mizusawa M, Miller H, Green R, Lee R, Durante M, Perkins R, Hewitt C, Simner PJ, Carroll KC, Hayden RT, Zhang SX. 2017. Can multidrug-resistant *Candida auris* be reliably identified in clinical microbiology laboratories? *J Clin Microbiol* **55**:638–640. doi:10.1128/JCM.02202-16
 55. Montoya Mendoza, A. M. Gloria María González González., 2014. *Trichosporon* spp.: an emerging fungal pathogen.. *Medicina universitaria*, 16(4), pp. 37-43.
 56. Neofytos, D. *et al.* (2013) ‘Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy’, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2), pp. 144–149. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.001.
 57. Newell D. Peter *et al.* (2013) 'A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST †', *JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOLOGY EDUCATION*, p. 238-243 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.637>
 58. Nilsson, R. H. *et al.* (2008) ‘Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification’, *Evolutionary Bioinformatics*, 2008(4), pp. 193–201. doi: 10.4137/EBO.S653.
 59. Norvell LL (2011) Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new Code. *Mycotaxon* 116: 481–490.
 60. Papon, N. *et al.* (2013) ‘*Candida guilliermondii*: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics’, *Current Genetics*, 59(3), pp. 73–90. doi: 10.1007/s00294-013-0391-0.
 61. Pfaller, M. A. *et al.* (2006) ‘*Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program’, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), pp. 3551–3556. doi: 10.1128/JCM.00865-06.
 62. Pfaller, M. A. *et al.* (2008) ‘*Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005’, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), pp. 515–521. doi: 10.1128/JCM.01915-07.

63. Pincus, D. H., Orenga, S. and Chatellier, S. (2007) 'Yeast identification - Past, present, and future methods', *Medical Mycology*, 45(2), pp. 97–121. doi: 10.1080/13693780601059936.
64. Reis, V. R. *et al.* (2013) 'Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation', *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), pp. 1121–1131. doi: 10.1590/S1517-83822014005000020.
65. Reynolds DR, Taylor JW (1992) Article 59: reinterpretation or revision? *Taxon* 42: 91–98.
66. Riquelme, A. J. M. και συν., 2003. *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia After *Saccharomyces boulardii* Treatment in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 33(1), pp. 41-43.
67. Rodríguez-Kessler, M., de la Luz Guerrero-González, M. and Jiménez-Bremont, J. F. (2012) 'Dimorphism and pathogenicity of the opportunistic Ascomycota *Candida albicans*', *Dimorphic Fungi: Their importance as Models for Differentiation and Fungal Pathogenesis*, (June), pp. 35–45. doi: 10.2174/978160805364311201010035.
68. Rosa, S. M. A. *et al.* (1998) 'Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*', *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 70–72, pp. 127–135. doi: 10.1007/BF02920130.
69. Saito, T. L. *et al.* (2004) 'SCMD: *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database', *Nucleic Acids Research*, 32(DATABASE ISS.), pp. 319–322. doi: 10.1093/nar/gkh113.
70. Sanchez Betancourt, A. A. *et al.* (2016) 'Candida famata mediastinitis. A rare complication of open heart surgery. Case report and brief review', *IDCases*, 5, pp. 37–39. doi: 10.1016/j.idcr.2016.07.001.
71. Sardi, J. C. O. *et al.* (2013) 'Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options', *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART1), pp. 10–24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.
72. Schoofs, A. *et al.* (1997) 'Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected

- patients', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(4), pp. 296–300. doi: 10.1007/BF01695634.
73. Shiang, N. L. *et al.* (2007) 'Identification of medically important *Candida* and non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array', *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), pp. 2220–2229. doi: 10.1128/JCM.00543-07.
 74. Silva, S. *et al.* (2012) '*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance', *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp. 288–305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
 75. Strobe, P. K. *et al.* (2015) 'The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen', *Genome Research*, 125(5), pp. 762–774. doi: 10.1101/gr.185538.114.
 76. Taylor John W. (2011) 'One Fungus=One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR', *IMA Fungus* · volume 2 · no 2: 113–120. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.01
 77. Trail, F. (2007) 'Fungal cannons: Explosive spore discharge in the Ascomycota', *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), pp. 12–18. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00900.x.
 78. Trofa, D., Gácsér, A. and Nosanchuk, J. D. (2008) '*Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen', *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), pp. 606–625. doi: 10.1128/CMR.00013-08.
 79. Voronovsky, A. A. *et al.* (2002) 'Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata*', *FEMS Yeast Research*, 2(3), pp. 381–388. doi: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00107.x.
 80. Walsh, T. J., Hayden, R. T. and Larone, D. H. (2018) *Larone's Medically Important Fungi*. 6th edn, *Larone's Medically Important Fungi*. 6th edn. doi: 10.1128/9781555819880.
 81. Wawrysiuk, S. *et al.* (2018) '*Candida lusitanae* – A case report of an intraperitoneal infection', *Przegląd Menopauzalny*, 17(2), pp. 94–96. doi: 10.5114/pm.2018.77310.
 82. Zieniuk, B. and Fabiszewska, A. (2019) '*Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(1), pp. 1–8. doi:

10.1007/s11274-018-2583-8.

83. Βυζαντιάδης, Τ.-. Α. Α., 2019. *Εισαγωγή στην Ιατρική Μυκητολογία , εργαστηριακή διάγνωση κλινικές προεκτάσεις.* s.l.:UNIVERSITY STUDIO PRESS A.E..